

UCH-FC
DOC-@
R572
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUIMICA



**EVALUACIÓN EXPERIMENTAL Y TEÓRICA DE LA
REACTIVIDAD DE DERIVADOS DE DI-N-ÓXIDOS
DE FENAZINA Y NITROFURANOS DE
TIOSEMICARBAZONAS EN SUS FORMAS
NEUTRAS Y RADICALARIAS COMO
POTENCIALES AGENTES FARMACOLÓGICOS**

Tesis presentada a la Universidad de Chile en cumplimiento de los requisitos
para optar al Grado académico de Doctor en Química

POR

CAROLINA RIGOL OLSEN

Directores de Tesis: Dr. Claudio Olea-Azar
Dr. Fernando Mendizábal Emaldía

Santiago, Septiembre 2006

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUIMICA

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL

Se informa a la comisión de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

CAROLINA RIGOL OLSEN

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 29 de Septiembre de 2006.

Director de Tesis:

Prof. Dr. Claudio Olea-Azar

Prof. Dr. Fernando Mendizábal Emeraldía

Comisión de Evaluación de Tesis:

Prof. Dra. Cecilia Rojas

Prof. Dr. Julio de la Fuente

Prof. Dr. Alejandro Toro

Prof. Dra. Francesca Faini

Prof. Dra. Ana María Atria








con tu puedo y con mi quiero

vamos juntos compañero...

A mi familia, a los de siempre

AGRADECIMIENTOS

En el transcurso de estos cuatro años en los que he desarrollado este trabajo he tenido la suerte de conocer personas muy interesantes y de gran condición humana que, en el día a día, me han ayudado de una forma u otra en la consecución de este trabajo. A ellos les manifiesto mi agradecimiento:

En primer lugar, a Claudio, con quien estos años de trabajo han significado por sobre el aprendizaje y el trabajo en conjunto, la formación de una gran amistad.

A Fernando por su permanente apoyo y confianza durante todo este tiempo.

A mi familia, siempre a mi lado y siempre lo más importante en mi vida.

A CONICYT, cuyas becas de doctorado y de ayuda de tesis (AT-4040020) hicieron posible la culminación de este proyecto académico y de vida.

A los miembros de la comisión, Cecilia Rojas, Alejandro Toro, Ana María Atria, Julio de la Fuente y Francesca Faini, quienes tuvieron siempre consejos constructivos en pos de la mejor tesis.

También quiero expresar mi agradecimiento a Pepe Vidal Gancedo, del Institut de Ciències de Materials de Barcelona – CSIC, por permitirme realizar una estancia de investigación en su laboratorio.

A Hugo, Mercedes, Lucía y Alejandra a quienes consideramos en la lejanía como parte de nuestro grupo de trabajo, y tuvieron una participación directa en la realización de esta tesis, con ideas, conocimientos y papers.

A Belén, quien amablemente me acogió y paseó por la hermosa Valencia.

A Juan Diego, al Doctor Morello y a Mario, por su ayuda, buena disposición, bichitos y microsomas.

A Carlos, Jorge, Lucy, Gerald, Rodolfo, Alejandra Pesce, Carola Jullian, Carlita y Marlene cada uno con su particular granito de arena, buena disposición, largas charlas y mucho café.

A la profe Ester, por su interés en mi futuro profesional. A la profe Maruja, a sus alagos y buenas palabras.

A Barcelona, a mi gente, fue un placer volver a veros, y comprobar que nada cambia con el tiempo.

A Rodrigo, Sandra, Marianito, Matteo y Facundo, por un lindo fin de semana en Madrid.

Y finalmente, a aquellos más que participaron indirectamente, de una u otra forma en mi formación.

RESUMEN

Algunas de las drogas utilizadas en el tratamiento de enfermedades como el Chagas y algunos tipos de cáncer son capaces de producir radicales libres, los cuales en presencia de un ambiente aeróbico generan mediante un reciclaje redox especies oxigenadas activas, que son sustancias altamente reactivas. Un exceso de radicales libres (estrés oxidativo) puede generar un daño celular importante siempre y cuando éste no logre ser prevenido y/o reparado por los mecanismos de defensa presentes en el organismo. Una técnica fundamental a este respecto es la espectroscopía de Resonancia del Espín Electrónico (RPE) que entrega en forma directa una gran información acerca de especies radicalarias. Conjuntamente, el uso de la técnica de Spin Trapping permite el estudio de las especies reactivas de oxígeno (ERO), generadas durante la metabolización de estas drogas. En este proyecto se estudió electroquímicamente y por espectroscopía RPE la capacidad generadora de radicales libres de una serie derivados de di-N-óxidos y nitrofuranos sintetizados como potenciales agentes anticancerígenos y antiparasitarios. Dicho estudio mostró que estos compuestos tienen la capacidad de generar radicales libres electroquímicamente, fotoquímicamente y biológicamente en medios parasitarios y mamíferos. Además, en presencia de oxígeno los radicales generados fueron capaces de producir ERO. Por otra parte, el estudio de la reactividad de estas drogas frente a radicales centrados en oxígeno y en nitrógeno, entregó información sobre el efecto de los sustituyentes sobre la reactividad y estabilidad de estas especies. Finalmente se realizó un estudio teórico que reveló a partir de análisis conformacionales y cálculos de propiedades electrónicas la existencia de dos conformaciones posibles según el largo de la cadena lateral de las moléculas, las cuales tienen una incidencia directa en la reactividad y estabilidad de los compuestos y sus radicales.

SUMMARY

Some of the drugs used in the treatment of diseases such as Chagas' disease and some types of cancer are able to generate free radicals, which in an aerobic environment generate through a redox cycling phenomenon, highly reactive oxygen species. An excess of free radicals (known as oxidative stress) can produce an important cellular damage as long as it is not prevented or repaired by defence mechanisms available in the organism. A fundamental technique in this matter is Electron Spin Resonance spectroscopy (ESR) delivers in a direct way a large information regarding radical species. Along with it, the use of the Spin Trapping technique allows the study of reactive oxygen species generated during the biological metabolism of the drugs. This project studied the capacity for free radical generation, electrochemically and by ESR spectroscopy, of a new series of di-N-oxide derivatives synthesized as potential anticarcinogenic and antiparasitic compounds. This study showed these compounds were able to generate radical species electrochemically, photochemically and biologically, in parasitic and mammal media. Furthermore, in presence of oxygen the generated radicals were able to produce reactive oxygen species (ROS) On the other hand, the study of the reactivity of these drugs against oxygen and nitrogen centered radicals, revealed important information regarding the effect of the substituents on the reactivity and the stability of these species. Finally a theoretical study was performed that revealed, from conformational analysis and electronic properties calculations, the existence of two possible conformations depending on the length of the side chain of the molecules, which have a direct incidence on the reactivity and stability of these compounds and their radicals.

Índice general

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1.1. Los Radicales Libres | 9 |
| 1.1.1. Especies Reactivas de Oxígeno | 10 |
| 1.1.2. Mecanismos Antioxidantes | 13 |
| 1.2. Radicales Libres Combatiendo Enfermedades Parasitarias | 16 |
| 1.2.1. Mecanismos de Defensa de los Parásitos | 16 |
| 1.2.2. Fotosensibilización | 17 |
| 1.2.3. Moléculas Generadoras de Radicales Libres | 19 |
| 1.3. Hipótesis | 25 |
| 1.4. Objetivos de la Tesis | 26 |
| 1.4.1. Objetivos Generales | 26 |
| 1.4.2. Objetivos Específicos | 27 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| 2.1. Reactivos | 28 |
| 2.2. Técnicas Usadas | 29 |
| 2.2.1. Voltametría Cíclica (VC) | 29 |
| 2.2.2. Resonancia Paramagnética de Espín (RPE) | 31 |

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE GENERAL | 7 |
| 2.2.3. Cálculos Teóricos | 36 |
| 2.3. Voltametría Cíclica | 41 |
| 2.4. RPE | 41 |
| 2.5. Generación de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) | 42 |
| 2.6. Generación de radical hidroxilo ($\cdot OH$) | 42 |
| 2.7. Generación de radical DPPH | 43 |
| 2.8. Cálculos Teóricos | 43 |
| 2.9. Estudios Microsomales | 44 |
| 2.10. Estudios Fotoquímicos | 46 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 47 |
| 3.1. Estudio Electroquímico | 47 |
| 3.1.1. Nitrofuranos de Tiosemicarbazonas | 47 |
| 3.1.2. Di-N-óxidos de Fenazina | 51 |
| 3.2. Estudio RPE | 54 |
| 3.2.1. Nitrofuranos de Tiosemicarbazonas | 54 |
| 3.2.2. Di-N-óxidos de Fenazina | 56 |
| 3.3. Reactividad y Estabilidad | 59 |
| 3.3.1. Reactividad frente al Radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ | 60 |
| 3.3.2. Reactividad frente al Radical $\cdot OH$ | 62 |
| 3.3.3. Reactividad frente al Radical DPPH | 62 |
| 3.3.4. Estabilidad de los Radicales | 63 |
| 3.4. Estudio Microsomal | 68 |
| 3.4.1. Microsomas de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 69 |

| | |
|---|-----------|
| <i>ÍNDICE GENERAL</i> | 8 |
| 3.4.2. Microsomas de mamífero | 70 |
| 3.5. Estudio Fotoquímico: | 71 |
| 3.6. Estudio Teórico | 73 |
| 3.6.1. Nitrofuranos de Tiosemicarbazona | 73 |
| 3.6.2. Di-N-óxidos de Fenazina | 80 |
| 4. CONCLUSIONES | 84 |
| 5. PUBLICACIONES | 88 |

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Los Radicales Libres

Hoy en día está demostrada la presencia de los radicales libres de oxígeno en numerosos procesos metabólicos relevantes y se sabe que son los principales responsables de la toxicidad del oxígeno en los seres vivos, participando en la patogénesis de distintas enfermedades y en numerosas situaciones de estrés. Se conoce como radicales libres a las entidades moleculares (átomos, moléculas o iones) que poseen un electrón desapareado. Esto los hace generalmente inestables, extraordinariamente reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. Dependiendo de en qué orbital se encuentra más estable el electrón desapareado, es que se describe a los radicales como centrados en oxígeno, nitrógeno, carbono, etc.¹ La mayoría de los organismos aeróbicos, como los mamíferos por ejemplo, sobreviven a la acción de las especies reactivas generadas a partir del oxígeno gracias a que poseen un sistema de protección compuesto principalmente por antioxidantes y enzimas que metabolizan estas especies reactivas, apagándolas y generando a su vez otras especies más estables.

¹La International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) usa actualmente el término "radical" al referirse a los radicales libres, el cual antiguamente se usaba para designar un grupo substituyente enlazado a una entidad molecular.

1.1.1. Especies Reactivas de Oxígeno

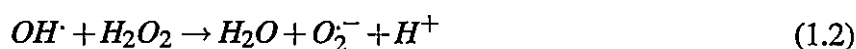
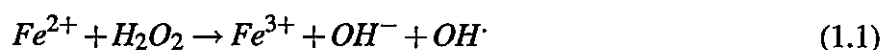
Habitualmente, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O_2), con los electrones que forman el enlace (σ) antienlazante con el mismo espín, es decir, en lo que se conoce como estado triplete. De esta manera el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción baja a temperatura fisiológica; sin embargo ya sea por reacciones puramente químicas, por acciones enzimáticas o por el efecto de radiaciones ionizantes, el oxígeno puede producir una serie de especies químicas prooxidantes denominadas especies reactivas de oxígeno (ERO).

Estrés Oxidativo

La generación de radicales libres y de otras ERO constituye un evento fisiológico continuo cumpliendo mediante su generación con funciones biológicas fundamentales. Sin embargo, su producción excesiva relativa a su velocidad de remoción puede conducir a diversas formas de daño celular, al reaccionar con proteínas, membranas lipídicas o ácidos nucleicos. Por lo anteriormente expuesto se comprende que si bien el oxígeno es imprescindible para el metabolismo y las funciones de un organismo aeróbico, no se deben olvidar los muchos efectos tóxicos que posee [1]. Se estima que el 95 % del O_2 mitocondrial es utilizado en la cadena respiratoria mitocondrial. Por este mecanismo se realiza el transporte de electrones desde un sustrato orgánico hasta un aceptor electrónico: el O_2 molecular. Este O_2 se reduce de esta manera, hasta llegar a agua como producto final. El porcentaje restante sigue una serie de reducciones monoelectrónicas con formación de productos de reducción parcial: las ERO.

Cuando el oxígeno molecular acepta un electrón proveniente de un agente reductor, el producto primario generado es un radical libre con carga negativa y capaz de oxidar moléculas orgánicas,

llamado anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). La adición de otro electrón conduce a la formación del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En esta molécula, que no es un radical libre, la unión entre ambos oxígenos es muy débil lo que le confiere una reactividad considerablemente alta. Así, el H_2O_2 se descompone fácilmente y luego de ganar otro electrón genera el radical hidroxilo ($\cdot OH$), uno de los radicales libres más reactivos que existen. Tiene la capacidad de reaccionar con casi todas las moléculas biológicas con constantes de velocidad del orden de 10^9 - $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Su formación a partir de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 ocurre a través de las reacciones de Fenton (1.1) y Haber-Weiss (1.2) y (1.3) las que requieren trazas de metales de transición como catalizadores. Cabe destacar que además del hierro otros metales pueden participar en estas reacciones de transferencia electrónica, regenerándose y actuando de forma cíclica [2, 3].



Finalmente, la incorporación de un cuarto electrón conduce a la formación de agua.

Una cuarta especie activada de oxígeno, el oxígeno singulete (1O_2) es reconocida como posible contribuidor al estrés oxidativo en sistemas vivos. El 1O_2 es un estado de alta energía del O_2 , en el cual sus dos electrones desapareados se encuentran con espines opuestos, aumentando en alrededor de 1 eV su energía respecto de su estado triplete basal y siendo así capaz de oxidar algunas moléculas biológicas, incluyendo moléculas lipídicas u olefínicas [4].

Si bien las ERO han sido implicadas como especies subyacentes al desarrollo de diversas condiciones patológicas como envejecimiento, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, cáncer, cataratas, cuadros inflamatorios crónicos, etc [5, 6, 7], recientemente estas especies han sido reconocidas también como importantes mediadores de una serie de eventos de naturaleza fisiológica. El hecho de que las ERO conduzcan a un daño celular, o que sus acciones se limiten a servir como señales biológicas, dependerá en parte de su naturaleza, de los mecanismos y sitios de su generación, y de los sustratos biológicos sobre los que actúan. No obstante, el mayor determinante de que las ERO tengan o no un carácter deletéreo está dado por el balance entre la velocidad a la cual estas especies son generadas y aquella a la cual son removidas por los mecanismos antioxidantes. En consecuencia, si no se neutralizan adecuadamente los radicales pueden dañar las células por tres mecanismos básicos [8]:

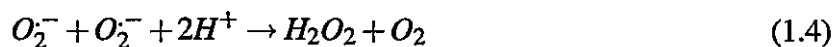
1. **Peroxidación Lipídica de las membranas:** Los enlaces dobles de la membrana poliinsaturada son vulnerables al ataque de radicales centrados en oxígeno generando una cadena radicalaria que conduce a una disminución de la fluidez de la membrana.
2. **Fragmentación del ADN:** Los radicales libres reaccionan con el ADN oxidando el esqueleto azúcar-fosfato y las bases nitrogenadas para producir rupturas en las hebras, intercambio de cromátides hermanas y entrecruzamientos de ADN y proteína.
3. **Enlaces cruzados en proteínas:** Los radicales libres promueven el cruce de enlaces en proteínas con grupos tiol, resultando en un aumento de la degradación de la proteína o en la pérdida de su actividad.



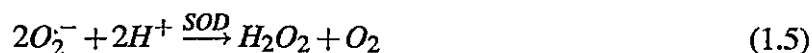
1.1.2. Mecanismos Antioxidantes

Afortunadamente para nosotros, la mayoría de los organismos aeróbicos tienen la capacidad de neutralizar a las ERO generadas y prevenir y/o contrarrestar la generación de estrés oxidativo, romper la cadena de propagación oxidativa y reparar el daño oxidativo celular. Existen varios mecanismos por los que se pueden apagar o neutralizar los diferentes radicales libres.

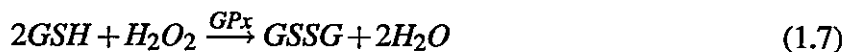
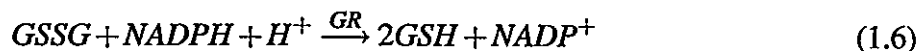
- Decaimiento espontáneo



- Acción de la enzima Superóxidodismutasa (SOD)



- Acción del glutatión mediada por la Glutathion Reductasa-Glutatión Peroxidasa (GR-GPx)



- Acción de la enzima Catalasa



- Antioxidantes endógenos y exógenos (Vitaminas E, A, C y β -caroteno)

Lo que ocurre a nivel molecular es que una vez generado, sea cual sea la causa, el radical $O_2^{\cdot -}$ experimenta una dismutación espontánea de segundo orden generando una molécula de H_2O_2 y una

de O_2 (1.4). Esta reacción es relativamente lenta a pH 7.4, alcanzando una constante de velocidad de segundo orden de $10^{4,5}$. Sin embargo, este radical presenta una mayor reactividad cuando su forma más común en medios biológicos ($HO_2\cdot$) abstrae un hidrógeno alílico de un lípido, donde la reacción de segundo orden presenta una constante de velocidad que excede 10^7 . Puesto que la dismutación espontánea no es lo suficientemente rápida para eliminar el radical superóxido, la naturaleza evolucionó para que los organismos pudieran deshacerse de esta especie altamente reactiva. La superóxido dismutasa (SOD) es la enzima que cataliza la reacción (1.5) para que ocurra a una velocidad tal ($<10^9$) de prevenir reacciones paralelas con otras moléculas esenciales [4].

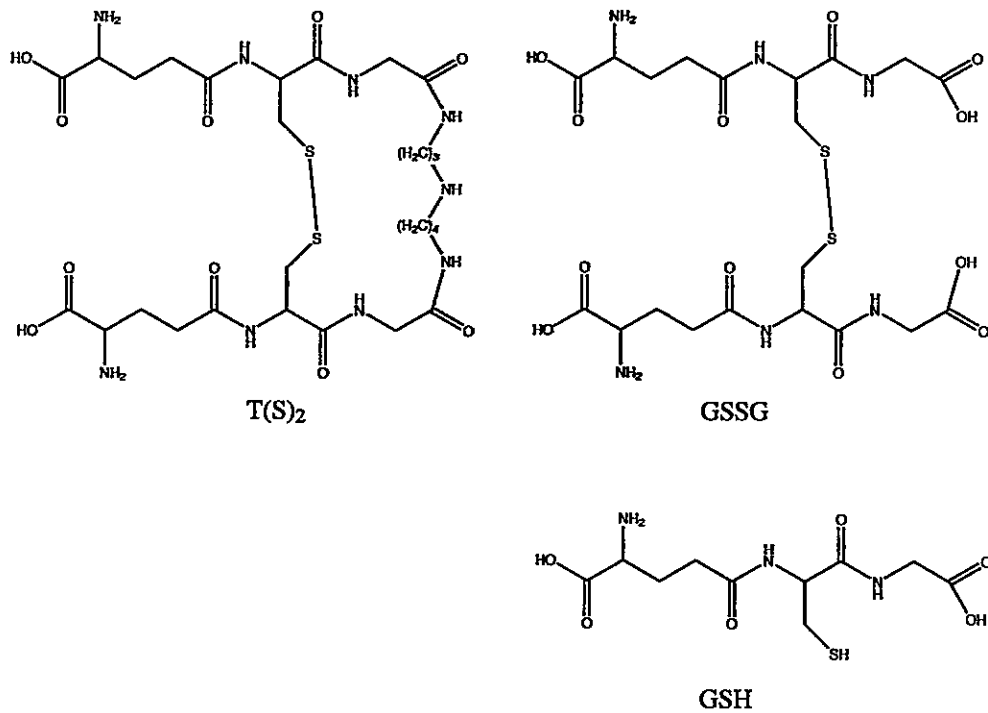


Figura 1.1: Tripanotión T(S)₂, Glutathion Oxidado (GSSG) y Glutathion Reducido (GSH)

Sin embargo, debido a la acción de esta enzima, el peróxido de hidrógeno se convierte en un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos, y dada su toxicidad es necesaria su transformación en compuestos menos peligrosos. Para ello existe la enzima catalasa que cataliza su

descomposición en agua y oxígeno (1.8). Existe otro grupo de enzimas que catalizan la desaparición del peróxido de hidrógeno. La Glutación Reductasa (GR) (1.6) es una flavoenzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) (Fig. 1.1) el cual será utilizado por la Glutación Peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido de hidrógeno y de lipoperóxidos (1.7). Esta enzima se encuentra en todos los organismos aeróbicos así como en algunas plantas superiores, por lo que aparenta ser una enzima cuasi universal. De no ocurrir estas reacciones, o si H_2O_2 se encuentra en concentraciones demasiado altas, cantidades traza de ion ferroso pueden catalizar la reacción de Fenton (1.1) para producir radical hidroxilo [4].

Por otra parte, el sistema de defensa antioxidante no enzimático está constituido por un grupo de sustancias que al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono o ácidos nucleicos. Los antioxidantes impiden que otras moléculas reaccionen con las ERO, al interactuar más rápido con ellas que con el resto de las moléculas presentes, ya sea dentro o fuera de las células. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas funcionalmente vitales o más importantes. Así actúan "apagando" radicales libres, con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Entre los antioxidantes más comunes se encuentran el ácido ascórbico (vitamina C), el α -tocopherol (vitamina E) y el β -caroteno. No son especies reciclables por lo que su reposición debe ser continua; he ahí la importancia de obtenerlos mediante la ingesta de nutrientes que los contienen.

1.2. Radicales Libres Combatiendo Enfermedades Parasitarias

Las enfermedades parasitarias en áreas tropicales y subtropicales constituyen un problema sanitario y económico. Teniendo en cuenta el progreso de la humanidad a finales del siglo XX, las enfermedades parasitarias son sinónimo de un nivel socioeconómico bajo. La enfermedad de Chagas, por ejemplo, está localizada en América Latina. Se calcula que 16-18 millones de personas están infectadas por *Trypanosoma cruzi*, el parásito causante de esta enfermedad que puede conducir a lesiones cardíacas incurables y 100 millones más está en riesgo de infección. Esta infección es transmitida por un insecto triatomino que se aloja en viviendas de zonas rurales y periurbanas pobres (*Triatoma Infestans*, más conocido como vinchuca). [9]. La Malaria, por otro lado, afecta a los países situados entre las líneas del Ecuador y el Trópico de Capricornio.

1.2.1. Mecanismos de Defensa de los Parásitos

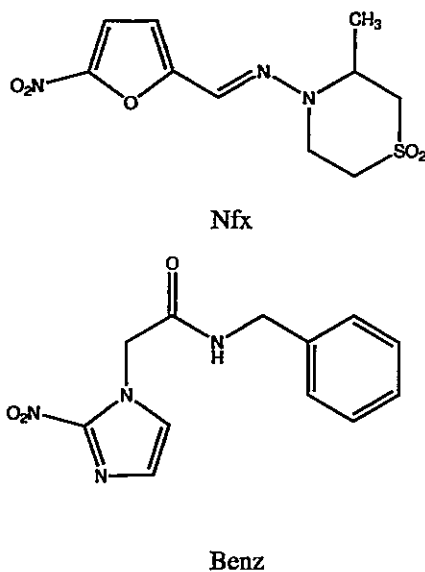
En general los microorganismos causantes de las enfermedades parasitarias poseen un sistema de defensa al ataque oxidativo carente de algunas proteínas, enzimas o antioxidantes que sí se encuentran presentes en organismos más evolucionados. Los Tripanosomátidos por ejemplo poseen un sistema redox basado en el tripanotión, un tiol de baja masa molecular [N1,N8-bis(glutathionil)espermidina] (Fig. 1.1), y la tripanotión reductasa (TryR). Sin embargo enzimas como la catalasa y la glutatión peroxidasa no se encuentran en el organismo de los tripanosomátidos, y la superóxido dismutasa está presente en concentraciones muy pequeñas [10].

Se ha comprobado que la TryR, posee propiedades físicas y químicas similares a la GR humana. De hecho, ambas enzimas parecen reducir sus sustratos mediante el mismo mecanismo catalítico, diferenciando en la especificidad de sus respectivos sustratos: el glutatión no es un sustrato o inhibidor

de la TryR, y de la misma manera, el tripanotión no es un sustrato de la GR [11]. Está comprobado que la especificidad mostrada por TryR se debe en gran parte a una región de enlace de la porción espermidínica del tripanotión en el sitio activo de la enzima. Sin embargo, la TryR manifiesta una alta actividad catalítica con varios análogos al tripanotión en los que la porción espermidínica es remplazada por cadenas laterales alifáticas que posean un grupo amino básico. La carencia de un sitio enlazante equivalente al de la TryR en la GR explicaría la ausencia total de actividad cuando la forma disulfida de la glutatión amida es probada con esta enzima. Los grupos glicil-carboxilatos (el glutatión es un péptido compuesto por tres aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina) del glutatión son los de importancia para su enlace con la GR [12]. Algo parecido ocurre en otras enfermedades parasitarias. Los parásitos de malaria (*Plasmodium*) están equipados, para mantener el equilibrio redox, de una gama de antioxidantes de bajo peso molecular (Glutatión entre otros) y de enzimas antioxidantes. Entre estas últimas se encuentran proteínas dependientes del glutatión y de la tiorredoxina, así como la superóxido dismutasa. Notablemente, los *Plasmodium* también carecen de catalasa y glutatión peroxidasa [13]. Con estos antecedentes el supuesto de que compuestos generadores de radicales libres altamente reactivos tipo ERO es una buena alternativa para combatir enfermedades parasitarias viene cobrando fuerza hace varias décadas. En efecto la quimioterapia contra el Mal del Chagas usada hasta hoy en día consiste en la administración de dos fármacos, Nifurtimox (Bayer, actualmente discontinuado) y Benznidazol (Roche), ambos con una actividad vía la formación de especies radicalarias comprobada.

1.2.2. Fotosensibilización

Otro tipo de mecanismo de gran interés farmacológico es el de fotosensibilización inducida por drogas. La interacción de la radiación electromagnética con la materia involucra un gran número



0.8

Figura 1.2: Nifurtimox (Nfx) y Benznidazol (Benz)

de procesos, entre otros, fotofísicos y fotoquímicos. Las reacciones que involucran la radiación UV/Vis y los sistemas biológicos son particularmente interesantes por su amplia gama de aplicaciones, entre ellas el fenómeno de fotosensibilización. La fotosensibilización requiere la presencia en el medio biológico de ciertas sustancias llamadas fotosensibilizadores, compuestos con requerimientos estructurales tales que permitan la inducción de una fototoxicidad al ser irradiados, mediante la subsecuente descomposición fotoquímica para formar productos estables, radicales libres y/o oxígeno singulete [14]. La reacción de fotosensibilización comienza con la absorción de la radiación por parte del fotosensibilizador, el cual se excita electrónicamente. Los caminos fototóxicos posibles son:

- I La transferencia de un electrón o un protón que puede conducir a la formación de especies radicalarias que produzcan un ataque directo sobre las biomoléculas o, en presencia de oxígeno,

que generen ERO produciendo así el daño oxidativo en ácidos nucleicos y otras biomoléculas.

Este tipo de procesos es conocido como reacciones del Tipo I.

II La transferencia de energía desde el estado excitado triplete del fotosensibilizador al oxígeno presente (en condiciones aeróbicas) produciendo el estado excitado singulete del oxígeno, el cual puede participar en la oxidación lipídica y proteínica de las membranas o reaccionar con ácidos nucleicos. Estas reacciones son conocidas como del Tipo II.

III La generación de un enlace covalente entre el fotosensibilizador y una macromolécula en particular induciendo igualmente el daño celular.

IV La descomposición del fotosensibilizador (probablemente mediante procesos homolíticos) resultando en fotoproductos que pueden actuar como toxinas o nuevos fotosensibilizadores.

La fotosensibilización es utilizada en el tratamiento de diversas enfermedades, incluido el cáncer, por su capacidad de localizar la generación de especies radicalarias, en las cercanías de un tumor por ejemplo.

1.2.3. Moléculas Generadoras de Radicales Libres

La investigación acerca de los radicales libres durante las últimas tres décadas ha permitido una mejor comprensión de la producción de radicales fisiológica e inducida por drogas en sistemas biológicos, como el de los parásitos. Se conoce que las drogas usadas en el tratamiento de estas enfermedades actúan mediante una variedad de mecanismos, sin embargo, las familias más estudiadas y las que dan aparentemente mejores resultados antiparasitarios son aquellas que involucran la generación de radicales libres en su mecanismo de acción [15, 16].

Existe una gran variedad de compuestos que son capaces de generar radicales libres. El requisito es que sean moléculas con un grupo electroquímicamente activo, que se pueda reducir u oxidar mediante la transferencia de un solo electrón. Además los radicales libres deben ser fáciles de generar, esto es, que el valor absoluto de los potenciales de reducción de estas moléculas sean más bajos que los potenciales de las enzimas reductoras a quienes adjudicamos la labor de generar los radicales libres [17].

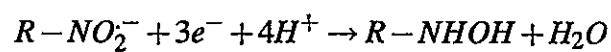
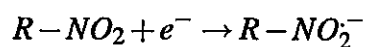
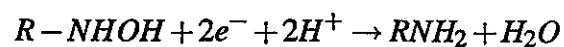
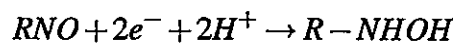
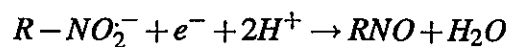
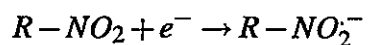
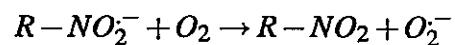
Varios tipos de compuestos pertenecientes a familias como nitroderivados y N-óxidos, entre muchos otros, cumplen con los requisitos necesarios para generar radicales libres y/o ERO en medios biológicos, ya sea en presencia de oxígeno o en su ausencia [18].

NITROCOMPUESTOS

Los nitrocompuestos son moléculas estudiadas que poseen un grupo nitro en su estructura el cual es capaz de reducirse generando una variedad de intermediarios dependiendo del medio en que ocurra la reducción y de si se encuentra en presencia de oxígeno. En medio aprótico y en ausencia de oxígeno, el comportamiento típico de reducción de un nitrocompuesto genera dos peaks correspondientes a las cuplas ($R-NO_2/R-NO_2^{\cdot-}$) para el primero donde apreciamos la generación de un radical libre y ($R-NO_2^{\cdot-}/R-NHOH$) para el segundo [19]. En un medio prótico el comportamiento varía un poco, generándose, por un lado, el paso del radical anión ($R-NO_2^{\cdot-}$) a la hidroxilamina ($R-NHOH$) en dos etapas en lugar de una, y por otro lado produciéndose una cuarta reducción que conduce el paso de la hidroxilamina a la amina ($R-NH_2$). Por otro lado, bajo condiciones aeróbicas, el radical nitro ($R-NO_2^{\cdot-}$) formado puede ser re-oxidado para regenerar el compuesto nitro original, y producir radical superóxido, provocando el ciclo generador de ERO mencionado anteriormente

[20]. Podemos observar ilustradas todas estas reacciones en el esquema 1.

La generación del radical aniónico $\text{RNO}_2^{\cdot-}$ siguiendo el mecanismo aeróbico representado en el esquema 1, cuando el Nifurtimox es agregado a microsomas de *T. cruzi*, ha sido caracterizada anteriormente por espectroscopía de Resonancia Paramagnética de Espín (RPE) así como su interacción con oxígeno generadora de ERO [17, 21]. Particularmente, los nitrofuranos son drogas sintéticas derivadas del furano, al que el agregado de un grupo nitro en la posición 5 del anillo heterocíclico le confiere propiedades antibacterianas.

Medio anaeróbico aprótico**Medio anaeróbico prótico****Medio aeróbico**

Esquema 1: Mecanismo general de reducción de nitrocompuestos

La activación reductiva biológica presenta una forma elegante de orientación de drogas hacia células con un contenido limitado de oxígeno. Los compuestos con aplicación clínica más extensiva en este campo son los derivados nitroaromáticos que han sido empleados en el tratamiento de infecciones anaeróbicas y en el tratamiento de algunos tipos de cáncer como citotoxinas de células hipóxicas y como sensibilizadores de radiación [22]. Si bien este tipo de compuestos es usado también en la quimioterapia para el tratamiento del Mal del Chagas, éstos han mostrado resultados insatisfactorios. Nitrofuranos como el Nifurtimox y nitroimidazoles como el Benznidazol (**Fig. 1.2**) han sido usados en casos agudos de esta parasitosis, pero su eficacia varía dependiendo del área geográfica, probablemente como consecuencia de la variedad de cepas de *T. cruzi* existentes [23]. Además ambas drogas producen efectos secundarios serios, que conducen a una variedad de fisiopatías incluyendo anorexia, vómitos, polineuropatía periférica, y dermatopatía alérgica [24], probablemente como consecuencia del daño oxidativo producido en los tejidos del huésped. Además, no entregan un tratamiento efectivo para la fase crónica de esta enfermedad [23].

N-ÓXIDOS

Varias familias de N-óxidos heterocíclicos han sido estudiadas hasta la fecha como agentes antitumorales. El más prominente de estos compuestos es el 3-amino-1,2,4-benzotriazina 1,4-dióxido (Tirapazamina, **Fig. 1.3**) [25]. La tirapazamina es un agente biorreducible selectivo para células hipóxicas [26]. Las células hipóxicas son células que reciben una cantidad de oxígeno menor a la habitual debido a que la proliferación de las células tumorales es más rápida que la formación de nuevos vasos sanguíneos. Estas células hipóxicas son resistentes tanto a la radioterapia como a la quimioterapia. Como en hipoxia se ven favorecidas las reacciones de reducción, una estrate-

gia pensada para atacar selectivamente dichas células es el diseño de profármacos que se activen precisamente por mecanismos de reducción y que por lo tanto sean más tóxicos para las células hipóxicas. Este tipo de medicamentos son denominados con el nombre genérico de agentes biorreducibles. La Tirapazamina es uno de ellos y son eficaces (o pretenden serlo) al ser utilizados en combinación con radioterapia o con otro tratamiento concomitante. La actividad antitumoral de la Tirapazamina se atribuye a su capacidad de dañar las moléculas de ADN. Específicamente el crédito se da a la generación de un radical libre, el cual es formado enzimáticamente, por vía de la reducción monoelectrónica de la Tirapazamina. En presencia de oxígeno, el radical se reoxida espontáneamente al compuesto original. Sin embargo, en células débilmente oxigenadas, esta reoxidación está bastante limitada, permitiendo al radical libre reaccionar y dañar componentes de la célula, incluyendo los ácidos nucleicos del ADN o el ARN [27]. Por otro lado, y a pesar de que es más conocida la citotoxicidad de este compuesto hacia células tumorales en condiciones hipóxicas que óxicas, también es capaz de generar toxicidad aeróbica, a través de las conocidas ERO, al reaccionar el radical con el oxígeno reoxidándose y generando superóxido por la reducción del oxígeno [28].

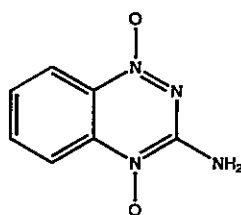


Figura 1.3: Tirapazamina

Por otro lado, se ha encontrado que algunos N-óxidos que contienen heterociclos muestran una actividad antitripanosomicida excelente. Su proceso bioreductivo y sus consecuencias biológicas son considerados como etapas cruciales en el mecanismo de acción, lo que convierte a estas familias de compuestos en muy buenos farmacóforos [18, 29, 30, 31, 32, 33].

En este trabajo que comprende un estudio experimental y teórico de dos familias de compuestos, se eligió por un lado una familia de N-óxidos provistos de sustituyentes con diferentes características electron dadoras/aceptoras. Lo propio se hizo con la otra familia de compuestos, los nitrofuranos, agregando la variable del largo de cadena, que puede influenciar en los cambios de conformación.

1.3. Hipótesis

De acuerdo a los antecedentes expuestos, este proyecto plantea las siguientes hipótesis:

En primer lugar se postula que los compuestos pertenecientes a las familias de nitrofuranos de tiosemicarbazidas y di-N-óxidos de fenazinas (**Fig. 1.4**) que se estudiarán serían eficientes generadores de radicales libres.

En segundo lugar las cadenas laterales y los sustituyentes enlazados al esqueleto de estos compuestos proporcionarían a los intermediarios radicalarios generados variabilidad en los potenciales de reducción, en su estabilidad y en su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ERO).

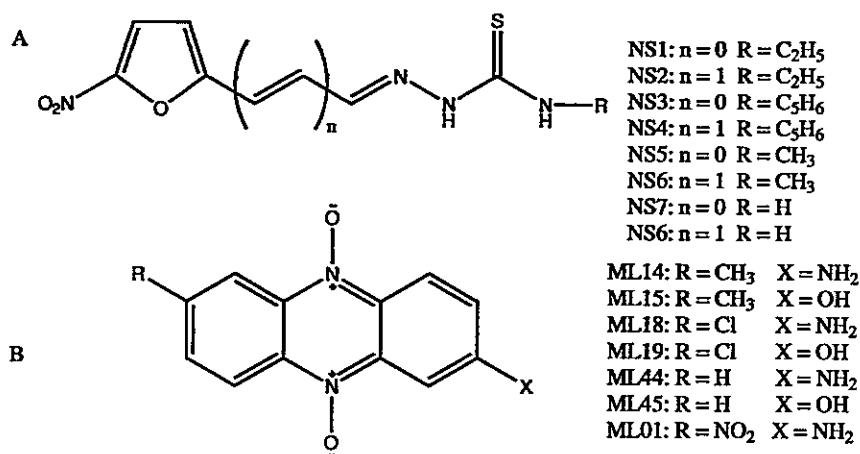


Figura 1.4: Derivados de 5-nitrofuril tiosemicarbazonas (A) y di-N-óxidos de fenazina (B)

1.4. Objetivos de la Tesis

1.4.1. Objetivos Generales

Este proyecto tuvo como objeto evaluar la capacidad de dos familias de compuestos, nitrofuranos de tiosemicarbazonas y di-N-óxidos de fenazinas, de generar radicales libres electroquímicamente, fotoquímicamente y en medios biológicos, y caracterizar sus intermediarios radicalarios mediante espectroscopía de Resonancia Paramagnética de Espín (RPE). Por otro lado se pretendió evaluar la reactividad de estas familias frente a especies radicalarias centradas en diferentes átomos, que podrían estar presentes en medios biológicos, como las ERO. Finalmente, se correlacionaron los datos obtenidos experimentalmente con propiedades calculadas teóricamente como apoyo para explicar los comportamientos observados.

1.4.2. Objetivos Específicos

- Objetivo 1.** Analizar electroquímicamente los mecanismos de reducción de familias de nitrofuranos y di-N-óxidos, utilizando la técnica Voltametría Cíclica (VC) en dimetilsulfóxido (DM-SO). Obtener y caracterizar las especies radicalarias generadas electroquímicamente mediante espectroscopía de Resonancia Paramagnética de Espín (RPE).
- Objetivo 2.** Estudiar la reactividad de las formas neutras de los compuestos frente a radicales superóxido, hidroxilo y DPPH por Spin Trapping. Determinar las constantes de decaimiento de sus radicales.
- Objetivo 3.** Detectar y caracterizar los radicales libres generados en medios microsomaes mamíferos y parasitarios utilizando DMPO como atrapador de radicales.
- Objetivo 4.** Analizar la reactividad de estos compuestos activados fotoquímicamente frente a "spin probes", como derivados del TEMPO, así como su capacidad fotosensibilizadora.
- Objetivo 5.** Obtener las constantes de acoplamiento hiperfino a través de métodos de cálculo que usan la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT). Realizar un estudio conformacional (nitrofuranos) de la estructura electrónica de las moléculas neutras y sus correspondientes formas radicalarias utilizando metodologías DFT. Correlacionar propiedades electrónicas calculadas mediante esta metodología con los potenciales de reducción experimentales. Realizar superficies de energía potencial de ángulos diedros.

MATERIALES Y MÉTODOS

NOTA: usaremos el término RNO_x de ahora en adelante cuando nos refiramos a los nitrofuranos (x = 2) y N-óxidos (x = 1) en estudio.

2.1. Reactivos

Los reactivos 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), perclorato de tetrabutilamonio (TBAP), 3-(Carboxi)-2,2,5,5 tetrametil-1-pirrolidiniloxi (3-carboxi-proxil), radical 2,2-di(4-tert-octilfenil)-1-picrilhidrazil (DPPH) y dimetilsulfóxido (grado espectroscópico, DMSO) fueron adquiridos a través de Sigma-Aldrich.

La sal sulfato ferroso amónico hexahidratado (sal de Mohr, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y el acetonitrilo (ACN) fueron obtenidos de J.T. Baker. La dimetiformamida (DMF), el terbutóxido de potasio (KO_{tert}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) fueron provistos por Merck.

Los nitrofuranos de tiosemicarbazonas mostrados en la figura (1.4) fueron sintetizados por esta candidata de acuerdo a los métodos de síntesis descritos por G. Aguirre y col. [53] en el laboratorio del Dr. Hugo Cerecetto, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Los di-N-óxidos de fenazina (Fig. 1.4) fueron sintetizados por el grupo del Dr. Cerecetto [54].

2.2. Técnicas Usadas

2.2.1. Voltametría Cíclica (VC)

La voltametría cíclica es la técnica más usada para obtener información cualitativa acerca de sistemas que involucran reacciones electroquímicas. La importancia de esta técnica resulta de su capacidad de proveer información sobre la termodinámica de procesos redox, la cinética de reacciones de transferencia electrónica heterogéneas, posibles reacciones químicas acopladas o procesos de adsorción. Además ofrece la determinación rápida de los potenciales redox de especies electroactivas, y la evaluación del efecto del medio sobre los procesos redox. La voltametría cíclica consiste en el barrido lineal del potencial de un electrodo de trabajo estacionario en una dirección hasta alcanzar un potencial determinado, seguido del posterior barrido en la dirección contraria, en una solución sin agitación. Este ciclo puede realizarse varias veces si es requerido. Durante el barrido del potencial, el potenciostato del equipo mide la corriente resultante al potencial aplicado. El gráfico resultante, como lo muestra la figura 2.1, de la corriente (i) en función del potencial (E) se conoce como voltamograma cíclico.

En esta figura se observa como a medida que el potencial aplicado se acerca al potencial característico del proceso redox (E°), la corriente catódica empieza a aumentar, hasta que se alcanza el peak catódico, de potencial E_{pc} . Tras atravesar la región de potenciales en la que ocurre el proceso de reducción (90 mV aproximadamente), la dirección del barrido se revierte. Durante el barrido de regreso, las moléculas generadas en la mitad anterior del ciclo y acumuladas alrededor de la superficie del electrodo, son reoxidadas de vuelta a la molécula original, resultando en la aparición

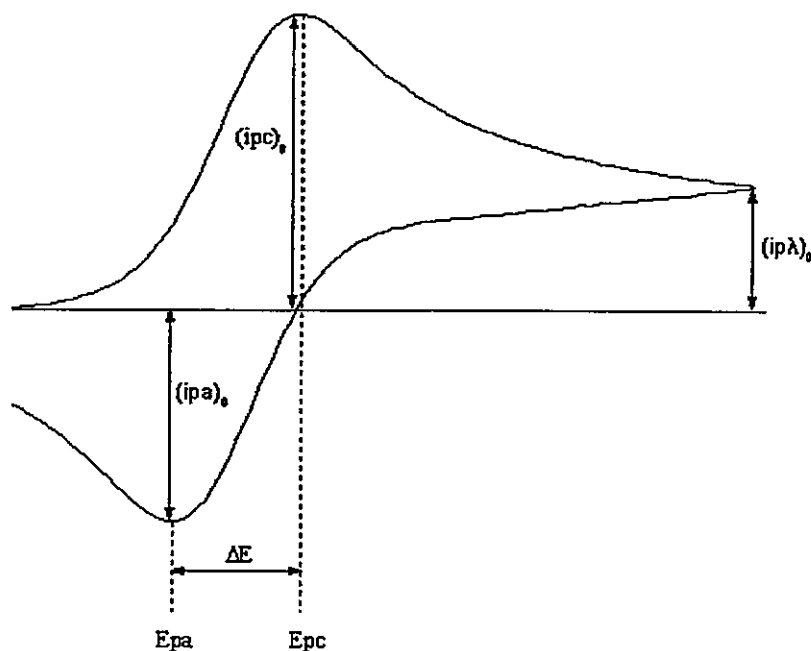


Figura 2.1: Ejemplo de un voltamograma cíclico y sus parámetros

del peak anódico [34].

Los principales parámetros que se pueden obtener de un voltamograma cíclico son los potenciales de peak E_{pc} y E_{pa} , la diferencia entre los potenciales ΔE y el cociente entre las corrientes anódica y catódica (ipa/ipc). Estos últimos son índices de la reversibilidad de la transferencia electroquímica. R. S. Nicholson estableció en 1966 una manera de calcular el cociente ipa/ipc refiriendo las corrientes al eje de valor cero, haciéndolas independientes de la línea base [35]. Ello se logra introduciendo las corrientes obtenidas de la figura 2.1, en la ecuación (2.1). Todas las corrientes son tomadas como valor absoluto.

$$\frac{ipa}{ipc} = \frac{(ipa)_0}{(ipc)_0} + \frac{(0,485)(ip\lambda)_0}{(ipc)_0} + 0,086 \quad (2.1)$$

2.2.2. Resonancia Paramagnética de Espín (RPE)

La espectroscopia de Resonancia Paramagnética de Espín (RPE) es una técnica que permite la detección y cuantificación de especies paramagnéticas, o sea, compuestos con electrones desapareados, entre los que se encuentran los radicales libres. Esta técnica puede ser usada para investigar concentraciones de radical muy bajas, mientras éstas sean lo suficientemente estables para que su presencia sea detectada. La espectroscopia RPE involucra el desdoblamiento inducido magnéticamente de estados de espín electrónicos. En esta espectroscopía la muestra es inmersa en un fuerte campo magnético y es expuesta a una radiación de frecuencia en el orden de las microondas (9,8 GHz, banda X).

La muestra absorbe la energía irradiada cuando la frecuencia de radiación coincide con la diferencia de energía entre los dos estados energéticos desdoblados por el campo magnético aplicado, siempre y cuando esta transición satisfaga las reglas de selección correspondientes. El desdoblamiento ocurre solamente cuando el electrón se encuentra en un estado con momento angular total diferente de cero. Esto significa que los electrones en átomos con estructura de capa cerrada al no mostrar este comportamiento no pueden ser detectados por RPE [36]. Para electrones libres los momentos de espín angular pueden tener dos orientaciones posibles y éstas dan lugar a dos estados de espín con polaridades opuestas. En la ausencia de un campo magnético externo estos dos estados son degenerados. Sin embargo, en presencia un campo magnético externo la degeneración se pierde, resultando en dos estados de diferente energía. Este desdoblamiento es conocido como

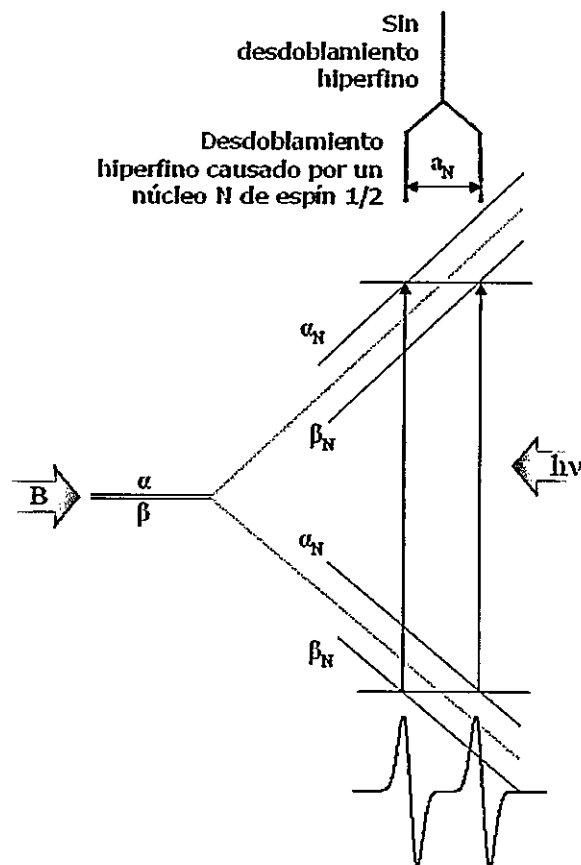


Figura 2.2: Desdoblamiento magnético e interacción nuclear hiperfina

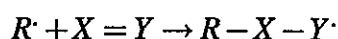
efecto Zeeman (Fig. 2.2). Un peak en la absorción ocurre cuando el campo magnético “sintoniza” los dos estados de espín de tal manera que la diferencia en energía coincide con la energía de irradiación. El conocimiento de los valores g (característicos de cada radical) y del detalle de las interacciones hiperfinas (valores a_N) permiten identificar las especies radicalarias, además de contener información sobre la distribución del electrón en la molécula. La estructura hiperfina provee una “huella dactilar” que permite identificar los tipos de radicales presentes en una muestra, y lo que es más importante para los químicos, la magnitud de los acoplamientos depende de la distribución del electrón desapareado en las cercanías de los núcleos magnéticos presentes. Los radicales aparecen a menudo como intermediarios durante una reacción, por consecuencia su identificación

entrega valiosa información acerca del mecanismo de reacción, y la medición de la variación de su concentración en el tiempo permite hacer estudios cinéticos.

En sistemas biológicos la detección directa de radicales libres no siempre es posible debido a su reactividad y naturaleza transitoria. Para ello se usa la técnica de Spin Trapping [37, 38].

SPIN TRAPPING

Las técnicas de RPE/Spin Trapping han sido aplicadas con éxito para determinar e identificar intermediarios radicalarios en sistemas biológicos. Esta técnica fue desarrollada a finales de los sesenta para facilitar la detección de radicales de corta vida por RPE y permite determinar su presencia atrapándolos para producir otro radical mucho más estable, el cual puede ser registrado por el equipo. Las reacciones de trapping son aquellas en las que se forma un producto de adición a un doble enlace tipo:



Se representa por $R\cdot$ al radical inestable que se desea identificar, y $X=Y$ representa el compuesto diamagnético sobre el que se produce la reacción de adición, llamado spin trap. Mientras que el producto de la reacción de adición, representado por $R-X-Y\cdot$, se denomina espín aducto y es un compuesto paramagnético. Para que la reacción de espín trapping sea útil tiene que cumplir varios requisitos:

1. La velocidad de reacción del radical con el spin trap tiene que ser superior a cualquiera de las reacciones que puedan tener lugar en el medio, de manera que éstas no entren en competencia con la de trapping.

2. El aducto de spin formado tiene que ser lo suficientemente estable como para permitir su detección por RPE.

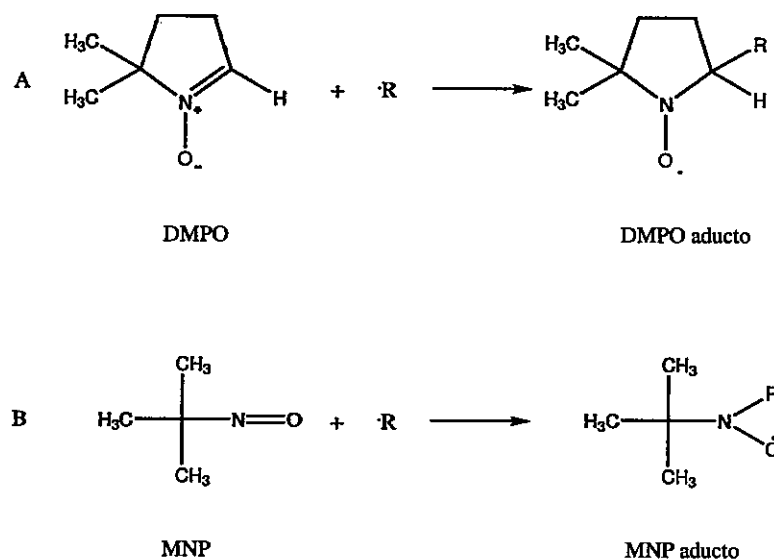


Figura 2.3: Desdoblamiento magnético e interacción nuclear hiperfina

Cada día aparecen nuevos spin traps y existen bases de datos que contienen miles de ellos, por ejemplo la base de datos del National Institute of Environmental Health Services [39] en la que se pueden buscar datos sobre la mayoría de los atrapadores que existen en el mercado o que se han sintetizado hasta el día de hoy. Los compuestos más utilizados como spin trap son aquellos que poseen los enlaces: C=C, C=N, N=N, C=O ó N=O. Sin embargo, debido a lo importante que es el proporcionar de forma directa o indirecta información acerca de la naturaleza del radical atrapado, R·, la gran mayoría de spin traps se basan en dos estructuras que proporcionan mayor información: nitrosocompuestos y nitronas (Fig. 2.3). Ambos tipos de atrapadores tienen como característica común que la reacción de adición con un radical conduce a la formación de un radical nitróxido [40]. Dentro de la familia de nitrocompuestos, los más usados como Spin Traps son el 2-metil-2-nitrosopropano (MNP) y ácido 3,5-dibromo-4-nitrosobenzosulfónico (DBNBS). Estos

atrapadores presentan la ventaja de que el radical reactivo se enlaza directamente con el nitrógeno del grupo nitroso, y por lo tanto se encuentra muy cercano al electrón desapareado, localizado principalmente en ese grupo. Esto deriva en la detección de acoplamientos hiperfinos adicionales generados por núcleos magnéticos pertenecientes al radical atrapado. La magnitud y la naturaleza de estos acoplamientos hace que la identificación del radical aducto sea más fácil y definitiva. Estos atrapadores tienen sin embargo la desventaja de formar aductos detectables de larga vida con un rango limitado de radicales, por lo general únicamente centrados en un átomo de carbono. Estos atrapadores forman aductos que decaen en minutos mientras que las nitronas logran formar radicales aductos mucho más estables. Dentro de la familia de las nitronas las más usadas como spin traps son 5,5-dimetil-1-pirrolina N-óxido (DMPO) y α -fenil *tert*-butil nitrona (PBN), 5-dietoxifosforil-5-metil-1-pirrolina N-óxido (DEPMPO), y α -(4-Piridil-1-óxido)-N-terbutilnitrona (POBN). Las nitronas forman a menudo aductos radicalarios de larga vida con una gama amplia de especies radicalarias, centradas en átomos de carbono, nitrógeno, oxígeno u azufre. La desventaja que poseen estos atrapadores que se enlazan al radical mediante el átomo de carbono adyacente al grupo nitróxido, dejándolo por lo tanto más distante del orbital molecular que contiene el electrón desapareado. Como resultado, no es siempre posible resolver los acoplamientos hiperfinos del radical atrapado en sí, haciendo la asignación de las líneas espectrales observadas de una especie en particular mucho más complicada. Sin embargo la magnitud de los acoplamientos hiperfinos generados por el nitrógeno del grupo nitróxido y especialmente por el β -hidrógeno depende, sobre todo en las nitronas cíclicas, de la naturaleza y estructura del radical agregado como resultado de la influencia de estas especies en la conformación de la nitrona. Así se puede obtener información valiosa sobre la naturaleza del radical atrapado [41].

2.2.3. Cálculos Teóricos

Otra rama de la química explorada durante los últimos años centrada en racionalizar los resultados experimentales es la Química Computacional. Mediante cálculos y modelos teóricos obtenemos respuestas sobre la molécula no siempre accesibles experimentalmente.

La optimización de geometrías es el indispensable punto de partida de la química computacional. A partir de ella es que se obtiene toda la información requerida de una molécula (distancias y ángulos de enlace, energía, potenciales de ionización, afinidades electrónicas, etc), o de un sistema (constantes de equilibrio, propiedades termodinámicas como entalpías o energías libres, potenciales de reducción, estados de transición, etc). Sin embargo el tratamiento mecánico cuántico de sistemas moleculares de n átomos y N electrones es intratable matemáticamente. Los métodos de cálculo utilizan rutinariamente, y plenamente justificada en la mayoría de los casos, la aproximación de Born-Oppenheimer para separar los movimientos nucleares y electrónicos. Consecuentemente es necesario únicamente resolver la ecuación de Schrödinger no relativista para el sistema electrónico, introduciendo las posiciones nucleares como parámetros. Los métodos químico cuánticos proveen metodologías prácticas para obtener soluciones aproximadas en sistemas moleculares [42, 43]. En particular la aproximación de Hartree-Fock (HF) transforma el complejo problema N -electrónico en N efectivos problemas de un electrón, donde la repulsión electrónica es tratada como un campo promedio. La ecuación secular de HF es entonces derivada minimizando la energía variacionalmente, (la energía será siempre mayor, o en la mejor de las hipótesis igual, a la energía exacta [44]) respecto de las elecciones de orbitales moleculares realizadas. A pesar de su simpleza, la aproximación de HF no es muy precisa porque no incluye efectos de correlación electrónica. La Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT) permite tratar estas correlaciones y manejar el proble-

ma polielectrónico considerando a la energía como una funcional de la densidad electrónica. Como resultado en DFT se resuelve el mismo problema monolectrónico que en HF, reemplazando el operados de Fock por una funcional de la densidad [45, 46]. De esta manera los métodos DFT son capaces de generar predicciones muy razonables de propiedades espectroscópicas en general, o en particular y de mayor interés para nosotros, de constantes de acoplamiento hiperfino [47]. Se obtienen los mejores resultados con la funcional de intercambio de 3 parámetros de Becke [48] con correlación electrónica no local de Lee-Yang-Parr [49](B3LYP).

CÁLCULO DE PROPIEDADES ELECTRÓNICAS

Constantes de Acoplamiento Hiperfino. Con objeto de realizar la asignación de las constantes experimentales a los diferentes núcleos de un radical, existen distintos métodos teóricos de muy diferentes grados de dificultad y costo computacional. Previamente, es importante aclarar el concepto de densidad de espín. La densidad de electrones es la suma de las densidades para los electrones α y β . La densidad de espín refleja la probabilidad de encontrar un exceso de electrones α respecto a los β en un sistema de capa abierta. En un sistema donde la densidad de electrones α es igual a la de electrones β , la densidad de espín es cero. Es una propiedad importante en moléculas que tienen electrones desapareados.

$$\rho_s(r) = \rho_s^\alpha(r) - \rho_s^\beta(r)$$

Sin embargo, la propiedad que permite conocer los acoplamientos existentes entre el electrón desapareado y los núcleos magnéticos presentes en la molécula y que se obtiene a partir de un espectro RPE es la constante de acoplamiento hiperfino. La ecuación de McConnell [50] es utilizada para calcular las constantes de acoplamiento hiperfino a partir de las densidades de espín según:

$$a(r) = Q\rho_s(r)$$

donde Q es una constante que depende del átomo donde está centrado el radical.

Afinidad Electrónica. La afinidad electrónica (AE), según su definición IUPAC, es la energía requerida para separar un electrón de un ión con una única carga negativa (energía del proceso $X^- \rightarrow X + e^-$). Una definición equivalente y más común es la cantidad de energía que se libera

cuando un átomo neutro gaseoso en su estado energético más bajo (estado fundamental) capta un electrón y se transforma en un ión negativo en estado gaseoso. Así tenemos que:

$$AE = E_{inicial} - E_{final}$$

Por ende, para un radical generado a partir de la reducción de su forma neutra, la AE se calcularía mediante la diferencia de energías entre la forma neutra y la forma radicalaria de la molécula. Por lo que esta puede ser calculada fácilmente como la diferencia de energías obtenidas al optimizar la molécula con N y con N+1 electrones.

$$AE = E_N - E_{N+1}$$

Existe otra manera de calcular la AE. Aplicando el Teorema de Koopmans que establece que dada una función de onda de N electrones Ψ_N , la AE requerida para producir una función Ψ_{N+1} con idénticos orbitales, obtenida al agregar un electrón en el orbital χ_c , es simplemente $-\epsilon_c$ [43]. Si consideramos que el orbital que acepta el electrón nuevo es el orbital desocupado de menor energía (LUMO¹) entonces:

$$AE = -\epsilon_{LUMO}$$

Lo mismo se aplica al Potencial de Ionización (PI) obteniendo como relación:

$$PI = -\epsilon_{HOMO}$$

Funciones de Fukui. La función de Fukui ($f(r)$) fue introducida por Parr y Yang como una generalización del concepto de Orbitales Moleculares de Fukui [51], que centra la noción de reactividad en la interacción entre los orbitales frontera HOMO y LUMO. La función $f(r)$ está definida como

¹LUMO: Lowest Unoccupied Molecular Orbital
HOMO: Highest Occupied Molecular Orbital

el cambio de densidad electrónica en un punto del espacio cuando varía el número de electrones del sistema N , manteniendo el potencial externo (v), o geometría, constante.

Considerando la adición o remoción al sistema de un electrón, las funciones de Fukui vendrían definidas por las ecuaciones (2.2) y (2.3).

$$f^-(r) = \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r) \quad (2.2)$$

$$f^+(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r) \quad (2.3)$$

donde $\rho(r)$ es la densidad electrónica. Condensando bajo la resolución de "átomos en moléculas" de Yang and Mortier (AIM) obtenemos (2.4) y (2.5) [52]:

$$f_k^- = q_k^{N-1} - q_k^N \quad (2.4)$$

para el ataque de un electrófilo y

$$f_k^+ = q_k^N - q_k^{N+1} \quad (2.5)$$

para un ataque nucleofílico, donde q_k representa la carga atómica de Mulliken sobre el átomo k . Estas ecuaciones permiten a través de un cálculo sencillo de cargas atómicas calcular las funciones de Fukui condensadas en átomos para un ataque electrofílico, y para un ataque nucleofílico, lo que determina los sectores y específicamente los átomos susceptibles a sufrir el ataque en caso de enfrentarse ya sea a un electrófilo o a un nucleófilo.

2.3. Voltametría Cíclica

La Voltametría Cíclica se llevó a cabo en un equipo Metrohm 693 VA provisto de un convertor 694 VA Stand y un procesador 693 VA Processor y una celda de tres electrodos, usando como solvente DMSO ($1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), bajo una atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente, con TBAP como electrolito de soporte (0.1 mol L^{-1}). Se dispuso de un electrodo de gota colgante o suspendida de mercurio (HMDE) como electrodo de trabajo, un alambre de platino como electrodo auxiliar y un electrodo de calomelano saturado (SCE) como electrodo de referencia. Se trabajó a velocidades de barrido entre 100 y 2000 mV s^{-1} .

2.4. RPE

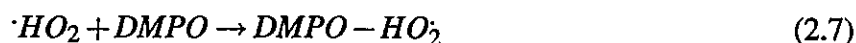
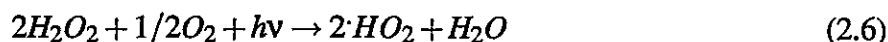
Los espectros de RPE fueron registrados en banda X (9.8 GHz) usando un espectrómetro Bruker ECS 106 equipado con cavidad rectangular y 50 KHz de modulación de campo. Las constantes de acoplamiento experimentales fueron obtenidas mediante simulación de espectros usando un programa WINEPR SimFonia Versión 1.25 y estimadas con una precisión de 0.05 G. Se realizaron cálculos teóricos descritos más adelante como ayuda en las simulaciones y a modo de comparación de las obtenidas experimentalmente. La generación electroquímica de los radicales aniónicos nitro y N-óxido se realizó a los potenciales obtenidos para sendas cuplas en VC y bajo las mismas condiciones de solvente y electrolito de soporte. La generación química de las especies radicalarias se realizó mediante la reacción de tertbutóxido de potasio y el DMSO en presencia de los compuestos en sus formas neutras. El tertbutóxido de potasio y el DMSO conforman un sistema fuertemente básico el cual genera los radicales libres por desprotonación [55]. De esta manera midiendo las in-

tensidades de las señales observadas a través del tiempo de los radicales generados químicamente fue posible determinar sus constantes de decaimiento.

Se utilizó como atrapador de Espín o Spin Trap el DMPO de la familia de las nitronas que es un buen atrapador de radicales de corta vida particularmente de radicales centrados en oxígeno. Esta técnica fue utilizada en los estudios de reactividad y generación microsomal de radicales libres [56].

2.5. Generación de radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El radical superóxido fue generado y atrapado como radical hidroperóxido ($\cdot HO_2$) mediante fotólisis del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) según la reacción (2.6), que resulta cuando el peróxido se encuentra a altas concentraciones (30 %) y su posterior interacción con el Spin Trap DMPO (2.7):



Se determinó la reactividad de RNOx con el radical superóxido analizando una solución que contenía, H_2O_2 24 %, DMPO 100 mM, y RNOx 1 y 0.8 mM en acetonitrilo (ACN) o dimetilformamida (DMF), dependiendo de las solubilidades.

2.6. Generación de radical hidroxilo ($\cdot OH$)

El radical $\cdot OH$ fue generado mediante la reacción de Fenton que consiste en la adición hierro (II) a una solución de peróxido de hidrógeno reaccionando juntos para generar radical hidroxilo

según la reacción de fenton:



Se procedió con la determinación de la reactividad de nitrofuranos con radical hidroxilo preparando una muestra que contenía H_2O_2 6 %, DMPO 100 mM, nitrofurano o di-N-óxido 0.8 mM y $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ 0.2 mM, atrapando el radical hidroxilo con DMPO.

2.7. Generación de radical DPPH

La reactividad frente al radical DPPH (radical 2,2-Di(4-tert-octilfenil)-1-picrilhidrazil) fue determinada en DMSO a concentraciones 1mM de DPPH y una concentración 8 veces mayor de RNO_x (1 mM DPPH y 8 mM de RNO_x) para priorizar la reacción del DPPH con el RNO_x por sobre el decaimiento del radical DPPH.

2.8. Cálculos Teóricos

Los modelos iniciales de las moléculas fueron diseñado de acuerdo a distancias y ángulos estándares provistos por el programa Hyperchem®. Las optimizaciones de geometrías por medio de mecánica molecular son capaces de arrojar geometrías diferentes para compuestos de estructura similar, dependiendo de la geometría de partida, principalmente en lo que concierne a las conformaciones en las cadenas laterales, y no en los anillos [57]. Por ello fue necesario realizar una exploración conformacional de los derivados del nitrofurano usando las herramientas del Hyperchem®, que realiza barridos sobre ángulos diedros especificados y separa las conformaciones más estables. Estas conformaciones fueron optimizadas utilizando el paquete de Mecánica Molecular

del Hyperchem®. La optimización fue hecha por métodos de gradiente. El campo de fuerza utilizado fue MM+, que otorga buenas geometrías para moléculas orgánicas [58]. Sin embargo, las energías estimadas por medio de mecánica molecular son generalmente energías conformacionales. Esto significa que la energía calculada pretende ser una energía que predecirá confiablemente la diferencia en energía entre una conformación y la siguiente encontrada. [59].

En el siguiente paso se utilizó el programa de cálculo Gaussian 98® para las optimizaciones de geometrías y los cálculos de propiedades electrónicas. El método de cálculo utilizado fue el híbrido B3LYP con la base 6-31G*.

Entre las propiedades electrónicas calculadas se encuentran la electroafinidad (EA) estimada como diferencia de energías entre la especie neutra y la radicalaria, o como el negativo de la energía del orbital LUMO, y la electrofilia [60, 43] calculadas según la ecuación (2.8):

$$\omega = \frac{\mu}{2\eta} = \frac{(PI+EA)^2}{8(PI-EA)} \cong \frac{(-\epsilon_{HOMO} - \epsilon_{LUMO})^2}{8((-\epsilon_{HOMO} + \epsilon_{LUMO}))} \quad (2.8)$$

donde ω es la electrofilia, μ es el potencial químico del sistema y η es su dureza global [43]. Se calcularon las funciones de Fukui condensadas para determinar la reactividad local de las moléculas al enfrentar un electrón (ec. (2.4) y (2.5)). Estos resultados fueron comparados con las constantes de acoplamiento como descriptores locales de reactividad.

2.9. Estudios Microsomales

MICROSOMAS DE *T. CRUZI*

Se determinó por RPE-Spin Trapping la capacidad de RNO_x de generar radicales libres en medios microsomales mediante un sistema que contenía 4 mg/ml de proteína de microsoma de

Trypanosoma cruzi, 100 mM DMPO y 1 mM de RNOx en DMSO [17]. Los epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28), fueron cultivados a 28°C en medio monofásico de Diamond [61], remplazando la sangre con hemina al 4 mM . Se agregó suero de feto de ternera a una concentración final de 4 %. Los parasitos fueron cosechados, centrifugados y pesados para preparar una solución stock de 20 mg/ml de proteína [62].²

MICROSOMAS DE MAMÍFERO

Se determinó por RPE-Spin Trapping la capacidad de RNOx de generar radicales libres en medios microsomales mediante un sistema que contenía 1,5 mg/ml de proteína de microsoma de mamífero, 100 mM DMPO y 1 mM de RNOx en DMSO. Los microsomas fueron cosechados según la referencia [63] y se determinó la cantidad de proteínas por ml según el método de Lowry [64], usando los siguientes reactivos:

- Solución Standard de seroalbumina bovina (500 mg/ml).
- Reactivo de Lowry, compuesto por tres soluciones que se mezclan en el momento de su utilización, y que son las siguientes: A: Carbonato sódico al 2 % en NaOH 0.1 M B: Sulfato cúprico al 1 % C: Tartrato sódico-potásico al 2 % En el momento de su uso se mezclan 10 ml de A con 0,1 ml de B y 0.1 ml de C.
- Reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteau (ácido fosfomolibdotungstico).

²8x10⁷ células corresponden a 1 mg de proteína or 12 mg de peso fresco.

2.10. Estudios Fotoquímicos

Se estudió la generación fotoquímica indirecta de radicales libres mediante su interacción con el radical "spin probe" 3-Carboxi-proxil. Un "spin probe" es un grupo paramagnético estable, usado para revelar el comportamiento paramagnético de una solución. Los más comunes son el TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi) y el 3-carboxi-proxil (3-(Carboxi)-2,2,5,5 tetrametil-1-pirrolidiniloxi), los cuales son estables al ser irradiados con luz UV-Vis y permiten detectar la generación de radicales. Este estudio fue realizado bajo las siguientes condiciones: 1 mM spin probe, 2 mM de derivado de RNOx en DMSO a temperatura ambiente con y sin luz UV-Vis. Además se estudió la generación directa de radicales libres al ser irradiada con luz UV-Vis una solución 2 mM en RNOx, usando DMSO como solvente, durante 5 minutos [65, 66].

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Estudio Electroquímico

3.1.1. Nitrofuranos de Tiosemicarbazonas

Se realizó un estudio electroquímico de los compuestos para determinar sus potenciales de reducción y los intermediarios que se generan por transferencias de carga sucesivas [67].

La figura 3.1 muestra el voltamograma observado cuando una solución del derivado NS3 en DMSO (1 mM) en presencia de 100 mM TBAP es barrida de 0 a -2.6 V a una velocidad de barrido de 2 V s⁻¹. Se puede apreciar claramente la aparición de una transferencia monoelectrónica reversible (cupla IIIc/IIIa) correspondiente a la generación del radical aniónico RNO₂^{•-} alrededor de los -0.80 V. Se estudió la estabilidad del intermediario radicalario modificando alguna condición electroquímica como la velocidad de barrido, mientras el resto se mantuvo inalterado. La razón de intensidades ipa/ipc calculada a partir de la ecuación (2.1) [35] prácticamente no varía mientras se incrementa la velocidad de barrido (de 100 a 2000 mV s⁻¹, no mostrado), un típico comportamiento de una transferencia de carga reversible ($Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$) [68].

Todos los derivados de nitrofurano exhibieron valores E_{1/2} (E_{1/2}=(E_{pa}+E_{pc})/2) menores que el reportado para la primera cupla de reducción de Nifurtimox (-0.88 V) (Fig. 1.2) [69] lo que

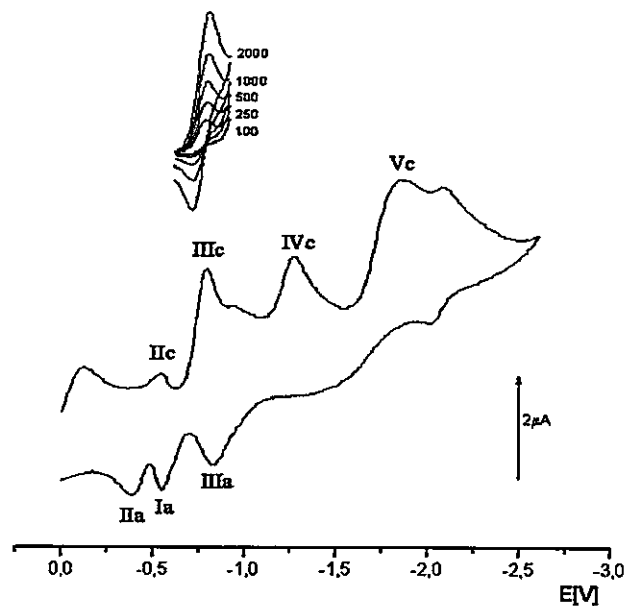


Figura 3.1: Voltamograma Cíclico de NS3 (1 mM), TBAP (100 mM) en DMSO y velocidades de barrido de la cupla IIIc de 100 a 2000 mV s^{-1}

indica que se trata de compuestos que tienen una mayor capacidad para reducirse y, por ende, una mejor capacidad para generar radicales libres. La tabla 3.1 lista los valores de las señales voltamétricas catódicas y anódicas y los valores de i_{pa}/i_{pc} de todos los nitrofuranos incluyendo a Nifurtimox. Se puede apreciar que todos los compuestos mostraron un comportamiento similar en DMSO. La siguiente señal catódica hacia los valores más negativos visiblemente irreversible en

Tabla 3.1: Parámetros voltamétricos correspondientes a la reducción del grupo nitro observada en las cuplas III y IV vs SCE en DMSO

| nitrofuranos | E_{pIIIc}/V | E_{pIIIa}/V | $\Delta E/V$ | $E_{1/2}/V$ | i_{pa}/i_{pc} | E_{pIVc}/V |
|--------------|---------------|---------------|--------------|-------------|-----------------|--------------|
| NS1 | -0.79 | -0.71 | 0.08 | -0.75 | 1.03 | -1.42 |
| NS2 | -0.79 | -0.71 | 0.08 | -0.75 | 1.07 | -1.28 |
| NS3 | -0.78 | -0.70 | 0.08 | -0.74 | 0.88 | -1.26 |
| NS4 | -0.77 | -0.70 | 0.07 | -0.74 | 0.94 | -1.12 |
| NS5 | -0.79 | -0.71 | 0.08 | -0.75 | 1.04 | -1.40 |
| NS6 | -0.79 | -0.70 | 0.09 | -0.75 | 1.08 | -1.26 |
| NS7 | -0.84 | -0.75 | 0.09 | -0.80 | 0.95 | -1.42 |
| NS8 | -0.84 | -0.72 | 0.12 | -0.78 | 1.03 | -1.31 |
| Nifurtimox | -0.91 | -0.85 | 0.06 | -0.88 | 1.01 | - |

todo el rango de velocidades de barrido utilizado (100 a 2000 mV s^{-1}) (IVc, Fig. 3.1) pertenece a la generación de la hidroxilamina vía una transferencia de tres electrones [21]. Los voltamogramas de todos los derivados muestran un pico anódico alrededor de -0.6 V (Ia), que podría atribuirse al proceso de reoxidación de la hidroxilamina RNHOH generada en IVc al derivado nitroso RNO. Un segundo barrido consecutivo presenta una señal tipo "hombro" apegada a IIc que puede proceder de la contraparte catódica (Ic) de esta señal y por lo tanto atribuible a la reacción $\text{RNHOH} \rightleftharpoons \text{RNO} + 2e^- + 2\text{H}^+$ la cual es reversible (figura no mostrada). Por otra parte, aparece una señal anterior a todas (IIc), inclusive a la generación del radical nitro, indicando que algunas moléculas siguen otro mecanismo de reducción. Esta señal corresponde a la reducción vía cuatro electrones y cuatro protones de una pequeña porción de moléculas que alcanzan la superficie del electrodo mientras la porción restante suministra los protones requeridos para esta reducción. La presencia en las moléculas de un grupo nitro incrementa la acidez del grupo N-H de la tiosemicarbazona ((ver $\text{N}_3\text{-H}_4$ en Fig. 3.2) el cual se vuelve capaz de protonar el grupo nitro y por lo tanto derivar la reducción directamente a la hidroxilamina (Fig.3.3). Este es un típico comportamiento del fenómeno de auto-protonación desplegado por compuestos nitro con grupos ácidos en sus moléculas [70, 71, 72, 73]. En suma, se observa en las cuplas III y IV la reducción de las moléculas cuyo grupo nitro no se encuentra protonado.

Por otro lado observamos la señal V en todos los voltamogramas que se presume corresponde a la reducción del grupo imino (CH=N) de la tiosemicarbazona [74]. Las señales que no fueron asignadas en la figura 3.1, observadas en el barrido de la solución blanco (TBAP + DMSO), corresponden a la reducción del TBAP. A las velocidades de barrido más lentas, se puede apreciar para algunos compuestos señales agudas que resultan de la ocurrencia de un fenómeno de adsorción de estas especies sobre la superficie del electrodo debido a la presencia en la estructura de

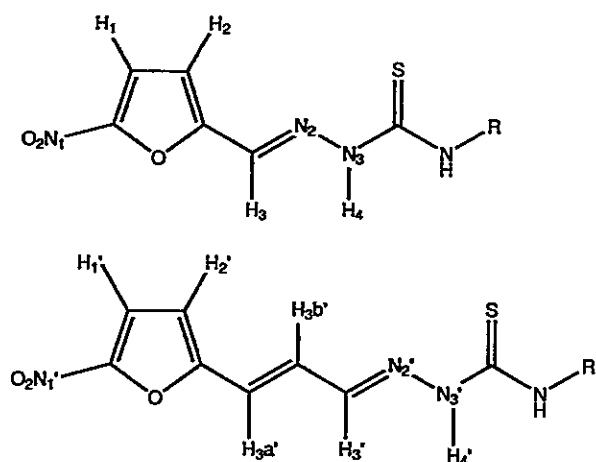


Figura 3.2: Nitrofuranos de tiosemicarbazone. Identificación de los núcleos.

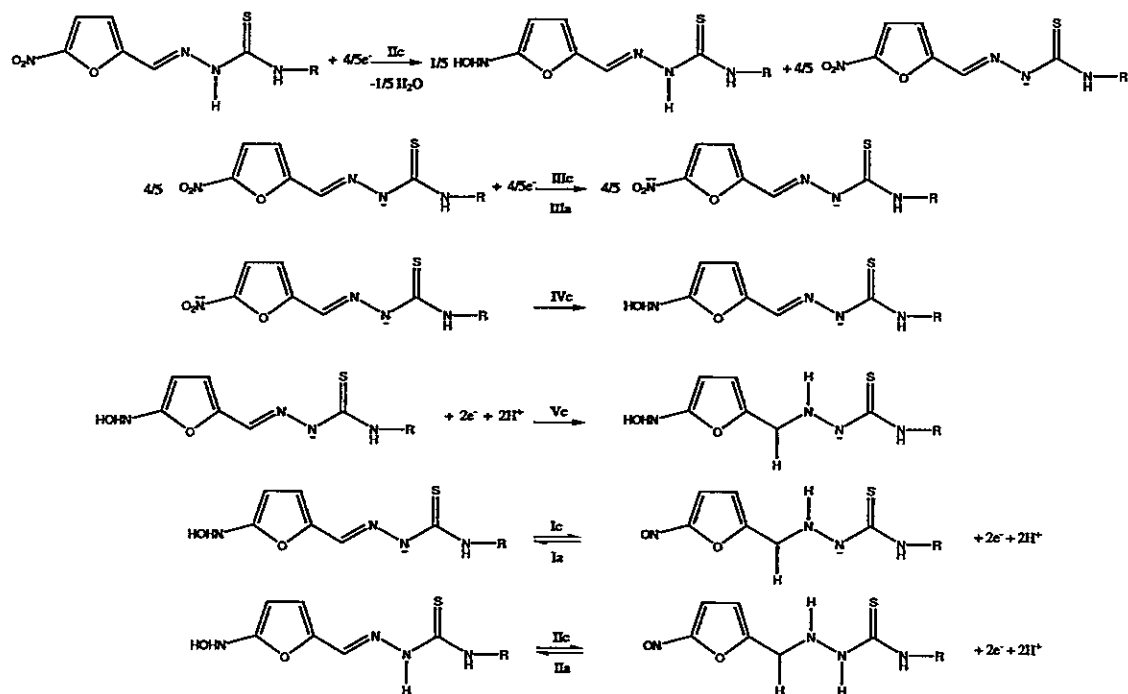


Figura 3.3: Mecanismo de reducción sugerido para los derivados de los nitrofuranos.

las moléculas de átomos de azufre (resultados no mostrados). El mecanismo de reducción de estos ocho nitrofuranos de tiosemicarbazonas que comprende las señales III, IV y V las preseñales I y II es propuesto en la figura 3.3.

3.1.2. Di-N-óxidos de Fenazina

La figura 3.4 muestra el voltamograma observado cuando una solución del derivado ML14 en DMSO (1 mM) en presencia de 100 mM TBAP es barrida de 0 a -2.6 V a una velocidad de barrido de 2 V s^{-1} . Se puede apreciar la aparición de dos transferencias monoelectrónicas reversibles correspondientes a la generación de un radical alrededor de los -1.00 V, para el caso del compuesto ML14, (cupla I_c/I_a) y otra a potenciales más negativos (cupla II_c/II_a). Los voltamogramas obtenidos para el resto de los di-N-óxidos fueron equivalentes, con la excepción del compuesto ML01 nitrado donde se aprecia además la generación del radical $\text{RNO}_2^{\cdot-}$ con $E_{pc} = 0.61 \text{ V}$. La razón de intensidades i_{pa}/i_{pc} calculada a partir de la ecuación de Nicholson [35] aumenta mientras se incrementa la velocidad de barrido (de 100 a 2000 mV s^{-1}), lo que equivale a una transferencia de carga reversible ($Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$) seguida por una reacción química irreversible ($Red \rightarrow C$) [68]. A pesar de que no se pudo aislar la segunda cupla reversible, es lógico pensar que el comportamiento de esta será similar al de la anterior puesto que las moléculas poseen dos grupos N-óxidos casi equivalentes.

Las dos transferencias monoelectrónicas que tienen lugar con este tipo de compuestos están reportadas como la generación de un radical deslocalizado en el anillo central que atenúa la carga positiva de los nitrógenos, y por el contrario agudiza la carga negativa sobre los oxígenos, promoviendo su protonación por algunas moléculas de agua que puedan estar presentes en el medio [75]. Está descrito también la descomposición de este radical mediante la liberación de radical $\cdot\text{OH}$

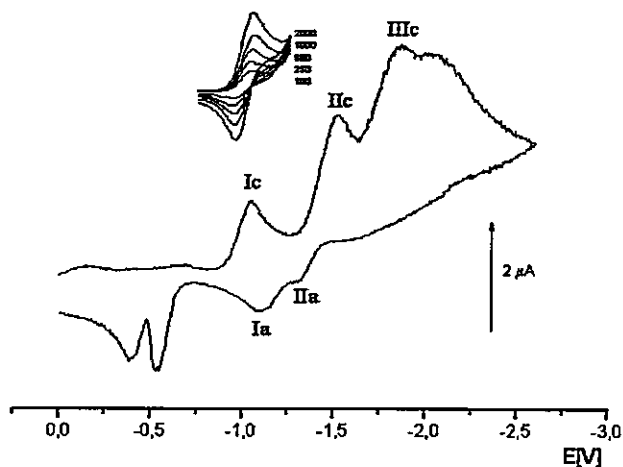


Figura 3.4: Voltamograma Cíclico de ML14 (1 mM), TBAP (100 mM) en DMSO y velocidades de barrido de la cupla Ic de 100 a 2000 mV s^{-1} .

como parte del mecanismo bioelectroquímico de este tipo de moléculas. Sin embargo hemos apreciado el mismo comportamiento electroquímico para el análogo mono-oxidado del compuesto ML14, que incluye las mismas tres cuplas redox, por lo que el grupo N-óxido debe permanecer oxidado por lo menos hasta la señal III. El voltamograma del análogo no oxidado de ML14 tiene presente la cupla II, por lo que esta fue asignada a la reducción del grupo imino. La tabla 3.2 lista los valores de las señales voltamétricas catódicas y anódicas y los valores de i_{pa}/i_{pc} de la cupla III de todos di-N-óxidos de fenazina. Además se pudo apreciar que todos los compuestos mostraron un comportamiento similar en DMSO. Los valores de $E_{1/2}$ fluctúan arriba y abajo, según las características de los sustituyentes, del valor reportado para la fenazina-5,10-dióxido con protones de sustituyentes [76]. La sustitución de grupos atractores de electrones como Cl y OH resultó en una disminución de los potenciales (potenciales menos negativos), al contrario de lo observado en las moléculas con sustituyentes dadores de electrones (CH_3 , NH_2). Como señalamos, la siguiente señal catódica hacia los valores más negativos visiblemente irreversible (IIIc, Fig. 3.4) y presente en el barrido

Tabla 3.2: Parámetros voltamétricos correspondientes a la reducción observada en la cupla I vs SCE en DMSO

| <i>N</i> -óxidos | E_{p1c}/V | E_{p1a}/V | $\Delta E/V$ | $E_{1/2}/V^a$ | i_{pa}/i_{pc} |
|-----------------------|-------------|-------------|--------------|--------------------|-----------------|
| ML14 | -1.05 | -0.91 | 0.14 | -0.98 | 1.05 |
| ML15 | -0.78 | -0.71 | 0.07 | -0.74 | 1.59 |
| ML18 | -0.96 | -0.80 | 0.16 | -0.88 | 1.15 |
| ML19 | -0.63 | -0.47 | 0.16 | -0.55 | 1.79 |
| ML44 | -1.01 | -0.92 | 0.09 | -0.96 | 1.58 |
| ML45 | -0.51 | -0.34 | 0.17 | -0.42 | 0.80 |
| ML01 ^b | -1.01 | -0.95 | 0.05 | -1.02 | - |
| fenazina-5,10-dióxido | - | - | - | -0.82 ^c | - |

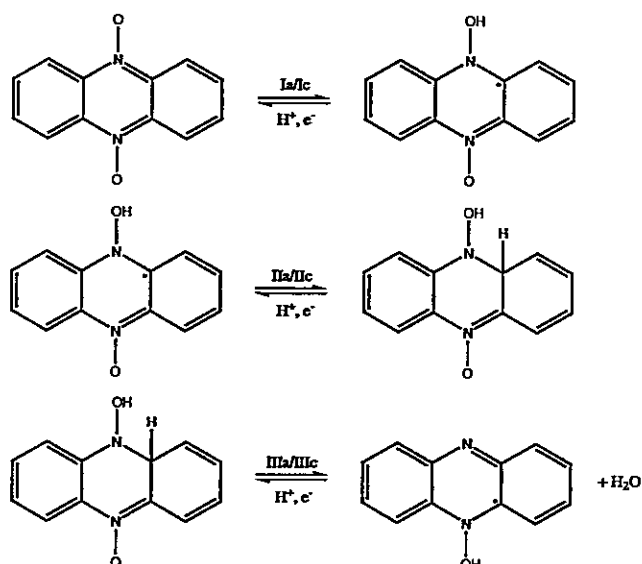
^a $E_{1/2} = (E_{p1c} + E_{p1a})/2$ ^b ML01 cupla $RNO_2 \rightleftharpoons RNO_2^-$ $E_{pc} = -0,61V$; $E_{pa} = -0,55V$; $E = 0,06V$; $E_{1/2} = -0,58V$ ^c dato de referencia [Chem.-Biol. Interactions, 60 (1986) 67-84]

Figura 3.5: Mecanismo de reducción sugerido para los derivados de di-N-óxidos.

del análogo mono-óxido, pero ausente en el compuesto no oxidado, involucra al oxígeno y podría deberse a la liberación de H_2O luego de la transferencia de un protón y un electrón. Esta señal es irreversible en todo el rango de velocidades de barrido utilizado (100 a 2000 $mV s^{-1}$) para los siete di-N-óxidos estudiados. La figura 3.5 muestra el mecanismo de reducción propuesto para la familia de di-N-óxidos de fenazinas que comprende las señales I, II y III.

3.2. Estudio RPE

3.2.1. Nitrofuranos de Tiosemicarbazonas

La interpretación de los espectros RPE fue realizado a través de un proceso de simulación con ayuda de cálculos teóricos, lo que llevó a la determinación de las constantes de acoplamiento de todos los núcleos magnéticos. La figura (3.6) muestra el espectro RPE experimental obtenido mediante reducción electroquímica del compuesto NS6 aplicando un potencial equivalente a la aparición de la cupla III del estudio electroquímico, a una concentración aproximada de 1 mM, con 100 mM TBAP en DMSO. La simulación de los espectros fue realizada usando las constantes de acoplamiento calculadas por DFT, modificando el ancho de línea, la modulación de amplitud y la componente lorentziana/gausiana hasta alcanzar la mayor similitud con el espectro experimental. La tabla 3.3 muestra las constantes de acoplamiento obtenidas de este proceso, que se observan en los espectros experimentales.

Todas las estructuras investigadas formaron intermediarios radicalarios estables a dichos potenciales. El radical \cdot NS1 (Fig. 1.4) exhibe un espectro experimental resultado de la simulación de dos tripletes asignados al efecto que producen los nitrógenos del grupo nitro (N_1) y la imina (N_2), y cuatro dobletes provocados por los hidrógenos H_1 del anillo furánico, H_3 perteneciente al grupo imino, y dos hidrógenos del grupo etilo (CH_2)(Fig. 3.2). El espectro simulado de \cdot NS3 resulta de un patrón de tres tripletes que aparecen por la interacción del electrón desapareado con los nitrógenos N_1 , N_2 y N_3 , y dos dobletes debidos a los núcleos H_1 y H_3 . El espectro del radical \cdot NS5 fue simulado a partir de dos tripletes asignados a los núcleos N_1 y N_2 , y tres dobletes asignados H_1 y a dos átomos de hidrógenos del grupo metilo. El radical \cdot NS7 generó un espectro RPE que

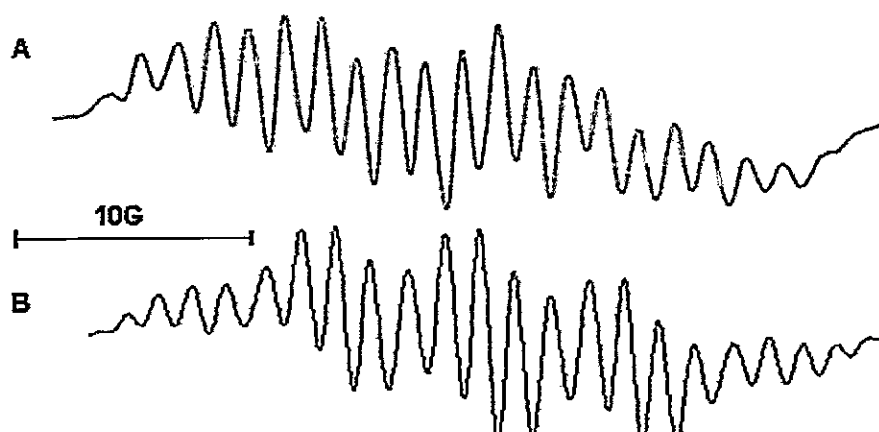


Figura 3.6: A- Espectro RPE experimental del nitro anión radical $\cdot\text{NS6}$ (1 mM) generado mediante reducción electroquímica con 100 mM TBAP en DMSO. Condiciones del equipo: Frecuencia de microonda: 9.71 GHz; Potencia de microonda: 20 mW; modulación de amplitud: 0.2 G; velocidad de barrido: 1.25 G/s; constante de tiempo: 0.5 s, número de barridos: 15. B- Simulación por computador usando constantes de acoplamiento calculadas por DFT (Tabla 3). El espectro fue simulado usando los siguientes parámetros: ancho de línea: 0.9 G; razón Lorentziana/Gausiana: 1.

fue simulado por tres tripletes de los nitrógenos N_1 , N_2 y N_3 y cuatro dobletes de los átomos H_1 , H_3 y los dos hidrógenos amínicos. El análisis del radical $\cdot\text{NS2}$ muestra un patrón de señales de tres tripletes asignados a los nitrógenos del grupo nitro (N_1'), la imina (N_2') y la tiosemicarbazona (N_3'), y cuatro dobletes provenientes de los hidrógenos H_1' y H_2' del anillo furánico y H_{3a}' y H_{3b}' pertenecientes al grupo etenodil ($\text{CH}=\text{CH}$). El espectro del radical $\cdot\text{NS4}$ fue simulado a partir de tres tripletes de los nitrógenos N_1' , N_2' y N_3' y cuatro dobletes de los hidrógenos H_2' , H_{3a}' , H_{3b}' y H_3' . El espectro de $\cdot\text{NS6}$ resultó de un patrón de señales de tres tripletes asignados a los núcleos N_1' , N_2' y N_3' , y a seis dobletes asignados a los hidrógenos H_1' , H_2' , H_{3a}' , H_{3b}' , H_3' , y uno de los hidrógenos del grupo metilo. Finalmente, el radical $\cdot\text{NS8}$ generó un espectro muy parecido al del radical $\cdot\text{NS2}$ simulado a partir del mismo patrón de señales. Respecto al análisis de los resultados obtenidos de los cálculos teóricos y su uso en la simulación de los espectros RPE, encontramos

Tabla 3.3: Constantes de acoplamiento hiperfino (Gauss) asignadas mediante cálculo por UB3LYP/6-31G*

| nitros | aN_1/aN_1' | aN_2/aN_2' | aN_3/aN_3' | aH_1/aH_1' | aH_2/aH_2' | $aH_3\alpha'$ | aH_3b' | aH_3/aH_3' | aR/aR' |
|--------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------|--------------|-----------------------------|
| NS1 | 2.49 | 8.76 | - | 3.43 | - | - | - | 1.33 | 2 x 0.36 (CH ₂) |
| NS2 | 0.78 | 6.54 | 1.20 | 0.68 | 1.32 | 3.08 | 6.52 | - | - |
| NS3 | 2.07 | 5.47 | 1.09 | 2.66 | - | 1.50 | - | - | - |
| NS4 | 0.78 | 4.42 | 1.20 | - | 1.25 | 2.71 | 3.94 | 0.73 | - |
| NS5 | 2.16 | 7.43 | - | 3.02 | - | - | - | - | 2 x 2.18 (CH ₃) |
| NS6 | 1.54 | 6.24 | 1.57 | 1.08 | 1.08 | 4.82 | 4.84 | 0.94 | 1.28 (CH ₃) |
| NS7 | 1.19 | 6.98 | 1.57 | 1.17 | - | - | - | 2.59 | 2 x 1.06 (NH ₂) |
| NS8 | 0.99 | 6.49 | 1.14 | 0.68 | 1.30 | 3.04 | 6.55 | - | - |

que la optimización de las geometrías mostró una dependencia directa entre las conformaciones y las hfcc's. Los radicales libres formados de derivados nitroheterocíclicos localizan generalmente el electrón desapareado en el nitrógeno del grupo nitro [77]. Sin embargo, esta familia de nitrofuranos de tiosemicarbazonas exhibió un comportamiento diferente centrando la densidad de espín alrededor de los núcleos N₂, N₂' y H₃, H_{3a}', H_{3b}'. Las especies radicalarias ·NS1, ·NS3, ·NS5, ·NS7 presentaron densidades de espín deslocalizadas entre los núcleos N₁ (grupo nitro), H₁, N₂ and H₃ (Tabla 3.3) mientras que los radicales ·NS2, ·NS4, ·NS6, ·NS8 deslocalizaron en electrón desapareado a través de un sistema conjugado plano que provee a los núcleos N₂', H_{3a}' y H_{3b}' de grandes densidades de espín. El estudio conformacional que condujo a estos resultados se muestra con mayor detalle en la sección 3.6.

3.2.2. Di-N-óxidos de Fenazina

Los radicales formados a partir de los derivados de la familia de di-N-óxidos de fenazina fueron generados electroquímicamente bajo las mismas condiciones establecidas en el estudio electroquímico (sección 3.1). Todas las estructuras investigadas formaron intermediarios radicalarios estables a los potenciales obtenidos del estudio electroquímico. Los espectros experimentales fueron simulados y las constantes de acoplamiento obtenidas fueron comparadas con aquellas calculadas teóricamente. Dada la simpleza de dichos espectros no fue necesario el apoyo de los cálculos

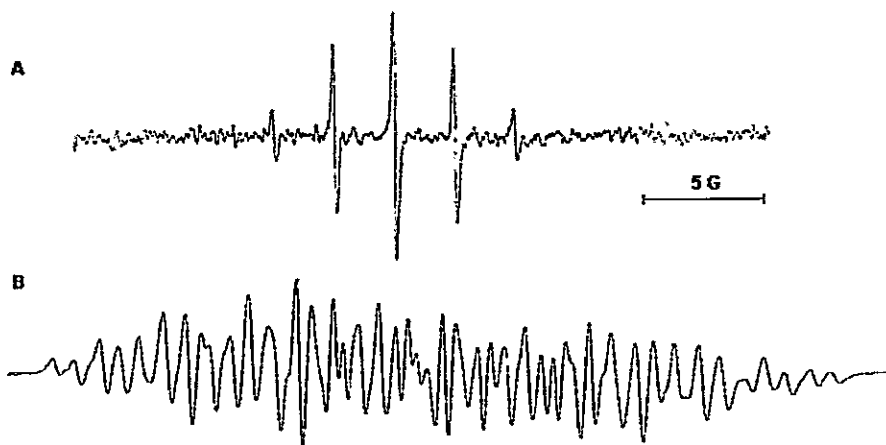


Figura 3.7: A- Espectro RPE experimental del nitro anión radical $\cdot\text{ML18}$ (1 mM) generado mediante reducción electroquímica con 100 mM TBAP en DMSO. Condiciones del equipo: Frecuencia de microonda: 9.71 GHz; Potencia de microonda: 20 mW; modulación de amplitud: 0.2 G; velocidad de barrido: 1.25 G/s; constante de tiempo: 0.5 s; número de barridos: 15. B- Simulación por computador usando los siguientes parámetros: ancho de línea: 0.9 G; razón Lorentziana/Gausiana: 1.

teóricos para el proceso de simulación propiamente tal. La tabla 3.4 muestra las constantes de acoplamiento obtenidas de este proceso, y las constantes teóricas obtenidas de los cálculos DFT. Todos los derivados di-N-óxidos exhibieron espectros experimentales de cinco líneas con un patrón de intensidades 1:2:3:2:1, equivalente a la interacción del electrón desapareado con dos núcleos magnéticos equivalentes con espín nuclear $I=1$, en este caso, dos nitrógenos, con constantes de acoplamiento $a\text{N}_1 = a\text{N}_2 = 2.40$ G.

Este patrón se debe a que el electrón desapareado se encuentra deslocalizado principalmente en el anillo imínico.

Este sistema utilizado para generar los radicales electroquímicamente permite variar el potencial de electrólisis y así explorar la generación de otros intermediarios paramagnéticos a potenciales

Tabla 3.4: Constantes de acoplamiento hiperfino (Gauss) experimentales y teóricas (UB3LYP/6-31G*) de los radicales N-óxido.

| N-óxidos | constantes | aN_1 | aN_2 | aH_1 | aH_2 |
|----------|----------------|--------|--------|--------|--------|
| ML14 | Experimentales | 2.50 | 2.50 | - | - |
| | Teóricas | 2.52 | 1.85 | 0.94 | 1.31 |
| ML15 | Experimentales | 2.42 | 2.42 | - | - |
| | Teóricas | 1.24 | 2.36 | 1.65 | 0.95 |
| ML18 | Experimentales | 2.37 | 2.37 | - | - |
| | Teóricas | 2.40 | 2.57 | 1.76 | 1.46 |
| ML19 | Experimentales | 2.48 | 2.48 | - | - |
| | Teóricas | 2.45 | 2.99 | 2.03 | 1.61 |
| ML44 | Experimentales | 2.39 | 2.39 | - | - |
| | Teóricas | 2.35 | 2.68 | 1.71 | 1.08 |
| ML45 | Experimentales | 2.45 | 2.45 | - | - |
| | Teóricas | 1.79 | 2.50 | 1.77 | 1.05 |
| ML01 | Experimentales | - | - | - | - |
| | Teóricas | 1.26 | 3.09 | 2.04 | 2.96 |

más negativos. La figura 3.7 (A) muestra el espectro RPE experimental obtenido mediante reducción electroquímica del compuesto ML19 aplicando un potencial equivalente a la aparición de la cupla I del estudio electroquímico ($E_{pc} \geq -1,0$ V), donde se observa claramente el patrón de señales característico de la interacción del electrón desapareado con dos átomos de nitrógeno equivalentes, indicando que la deslocalización del electrón se mantiene dentro del anillo central de las moléculas. El otro espectro mostrado en la figura se obtuvo al variar el potencial a valores más negativos ($E_{pc} \geq -1,7$ V). Se puede observar un aumento considerable del ancho del espectro debido a una mayor deslocalización del electrón en la molécula, y por lo tanto a un aumento del número de señales y de las constantes de acoplamiento. Puesto que se pierde el patrón de señales anterior, podemos decir que los nitrógenos responsables del desdoblamiento hiperfino en este espectro (aparte de la participación de otros núcleos) no son equivalentes. La tabla 3.5 muestra las constantes de acoplamiento que surgen de la simulación de estos dos espectros, y su comparación con las constantes obtenidas del registro de los espectros RPE de las fenazinas mono-N-óxido y di-N-óxido presentadas por Kubota y col. en 1968 [78]. En ella se observa la similitud entre los espectros a bajos y altos

Tabla 3.5: Constantes de acoplamiento hiperfino (Gauss) de ML19, Fenazina di-N-óxido y Fenazina mono-N-óxido

| Fen di-N-óxido | Fen mono-N-óxido | ML19 E bajos | ML19 E altos |
|--|------------------------|--|------------------------|
| 5.91 (N ₁ ,N ₂) | 7.58 (N ₁) | 2.55 (N ₁ ,N ₂) | 7.60 (N ₁) |
| 1.75 (4H) | 3.60 (N ₂) | - | 3.50 (N ₂) |
| 1.36 (4H) | 1.80 (4H) | - | 1.09 (4H) |
| - | 1.65 (2H) | - | 1.10 (2H) |
| - | 1.23 (2H) | - | - |

potenciales, y las fenazinas di-N-óxido y mono-N-óxido, respectivamente, lo que nos permite identificar el primer radical observado por RPE como el radical generado en la cupla I (Fig. 3.4) el que mantiene sus dos átomos de oxígeno, y por lo tanto la equivalencia de sus respectivos átomos de nitrógeno como se observa en la figura 3.7 (A), y, el segundo radical, como el radical generado en la cupla III, en el cual los dos nitrógenos pierden la equivalencia. Los resultados obtenidos de los experimentos de RPE confirman el mecanismo de reducción obtenido en el estudio electroquímico, con la generación de dos especies radicalarias, la primera de las cuales sería plausible de producirse a nivel biológico, por ser la que se genera a potenciales menos negativos.

3.3. Reactividad y Estabilidad

Se determinó la capacidad de los compuestos en estudio de "apagar" radicales libres para determinar si poseen alguna capacidad de tipo antioxidante. Para ello se hizo reaccionar a RNO_x con los radicales centrados en oxígeno, como las ERO presentes en medios biológicos: radicales superóxido e hidroxilo, y DPPH (radical 2,2-Di(4-tert-octilfenil)-1-picrilhidrazil) utilizado comunmente en ensayos de capacidad antioxidante. Además se calcularon las constantes de decaimiento de los radicales libres generados químicamente mediante el sistema terbutO⁻K⁺ / DMSO. Estos estudios se realizaron conjuntamente con nitrofuranos y N-óxidos para poder comparar comportamientos.

3.3.1. Reactividad frente al Radical superóxido $O_2^{\cdot-}$

Los radicales centrados en oxígeno tienen tiempos de vida muy cortos, debido a su alta reactividad, por lo que para ser medidos es necesario atraparlos con un Spin Trap. Como explicamos en la sección 2.2.2, un Spin Trap es un compuesto diamagnético que al reaccionar con una especie paramagnética inestable genera un aducto paramagnético, mucho más estable que la especie original, y por lo tanto medible por espectroscopía RPE. Esta es una técnica de medición indirecta para medir radicales libres muy reactivos por lo que determinar su reactividad con una especie en estudio (muestra) está condicionado por las velocidades de reacción atrapador-radical y radical-muestra. Si la reacción radical-muestra es más lenta que la reacción atrapador-radical, al registrar el espectro no será posible observar una disminución en la señal del aducto generado entre el atrapador y el radical. Ello no significa que no exista reacción entre ambos, radical y muestra, sino que esta no puede ser detectada por un problema cinético. Por otro lado, si la reacción atrapador-radical es más lenta que la reacción radical-muestra, sí podremos observar una disminución de la intensidad de la señal del aducto formado debido a que al reaccionar con la muestra, se habrá reducido la cantidad de radical disponible para ser atrapado por el Spin Trap. Este tipo de medición, sin embargo, es indirecta, lo que impide la realización de un estudio cinético, por lo que la comparación entre reactividades debe limitarse a una comparación entre las disminuciones de señal del Spin aducto generado por los distintos compuestos en estudio. El radical superóxido fue generado mediante la fotólisis del peróxido de hidrógeno a una concentración alta (de alrededor de 30 %) (sección 2.5). A pesar de que este método debiera generar radical superóxido y agua, se observaron señales correspondientes al aducto DMPO-OH \cdot , el cual se debe a la generación del radical hidroxilo debido a la fotólisis homolítica del H_2O_2 , o a la degradación del radical aducto DMPO-HO $_2\cdot$ a DMPO-OH \cdot , al ser el

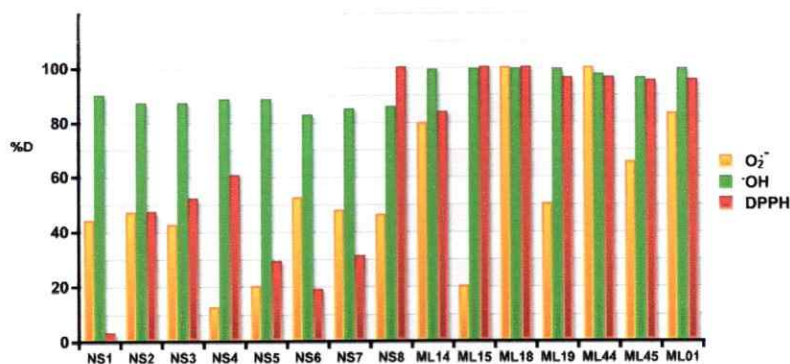


Figura 3.8: Reactividades de RNO_x respecto de los radicales O₂^{·-}, ·OH y DPPH descritas como %D (porcentaje de disminución de la señal).

primero un aducto inestable [80]. Se estandarizó la última fuente de DMPO-OH[·] manteniendo las condiciones de trabajo y de registro de los espectros lo más parecidas posible para todas las muestras, demorando lo menos posible para que el espectro sea representativo de las concentraciones de radical resultantes. La familia de nitrofuranos mostró en general un comportamiento “apagador” del radical superóxido menos fuerte que la de los N-óxidos. En el caso de los N-óxidos, se observó claramente la influencia de los sustituyentes en su capacidad de reaccionar con el radical superóxido. La figura 3.8 da cuenta de estos resultados. En ella se muestra el porcentaje de disminución de la señal RPE del aducto DMPO-HO₂[·], descrita como

$$\%D = \frac{(I_0 - I)}{I_0} * 100$$

para cada uno de los compuestos estudiados. Los compuestos con sustituyentes X = OH, mostraron una menor disminución de la señal. Este resultado se debe a la capacidad mesomérica dadora de electrones del grupo hidroxilo, que disminuye la estabilidad de los radicales resultantes.

3.3.2. Reactividad frente al Radical $\cdot\text{OH}$

En este experimento, el radical hidroxilo fue generado mediante la reacción de Fenton y atrapado por el Spin Trap DMPO como describimos en la sección 2.6. Comprobamos la gran capacidad de reducir la señal de DMPO- $\text{OH}\cdot$ por parte de todos los compuestos de ambas familias (Fig. 3.8). Lo que en realidad se explica por la alta reactividad del radical hidroxilo, no por nada calificado como uno de los radicales libres más reactivos que se conoce, reaccionando a velocidades equivalentes a su velocidad de difusión, con las moléculas del entorno donde se genera.

3.3.3. Reactividad frente al Radical DPPH

El caso del radical DPPH (radical 2,2-Di(4-*tert*-octilfenil)-1-picrilhidrazil) es diferente al de los radicales centrados en oxígeno. Esta especie existe de manera estable como radical, y por lo tanto se pueden preparar soluciones de DPPH de concentración conocida. La determinación de la reactividad de este radical con los compuestos en estudio es directa puesto que depende sólo de la cinética de la reacción entre el radical y la muestra. Se podría realizar un estudio cinético, pero para efectos de comparación, se midió la disminución de la intensidad de la señal a un tiempo determinado, reproducido de igual forma para todos los compuestos. Este radical es usado comunmente en un ensayo de determinación de capacidad antioxidante por UV-Vis [79], ya que el radical de color púrpura se reduce a la difenil picrilhidrazina de color amarillo al sustraer un hidrógeno de otra molécula. En este experimento se realizó el ensayo de capacidad antioxidante utilizando como técnica de detección del radical la espectroscopía RPE. El radical DPPH pierde un poco de estabilidad al ser disuelto en solventes apróticos, por lo que el experimento fue realizado a una concentración de nitrofurano y N-óxido tal de poder minimizar la reacción de decaimiento del radical DPPH al

reaccionar consigo mismo y maximizar la reacción entre RNO_x y radical, asegurando una cinética de pseudo-primer orden. La figura 3.8 muestra el porcentaje de disminución de la señal del espectro registrado al agregar RNO_x en un volumen tal de obtener las condiciones descritas en la sección 2.7. Observamos en general en los N-óxidos un mayor efecto apagador del radical DPPH que en los nitrofuranos. No se observa un efecto claro en el caso de los N-óxidos del sustituyente en su reactividad frente al DPPH. Sin embargo, sí vemos una tendencia a que los compuestos de cadena larga sean más reactivos que los de cadena corta. Veremos más adelante la importancia del largo de cadena en la estabilidad de los radicales, y como ello se ve condicionado por las conformaciones de las moléculas.

3.3.4. Estabilidad de los Radicales

En este experimento se midió la estabilidad de los radicales generados químicamente con el sistema reductor terbutOK y DMSO viendo la evolución en el tiempo de la señal RPE obtenida. Puesto que la espectroscopía de Resonancia Paramagnética de Espín fue usada en este caso más bien como técnica cualitativa, las constantes de decaimiento obtenidas son relativas, y comparables sólo entre ellas. Las constantes fueron obtenidas graficando $\ln[\text{rad}]$ para los N-óxidos y $1/[\text{rad}]$ para los nitrofuranos, en función del tiempo, como lo muestra la figura 3.9. La ecuación 3.1 surge de la integración de la ecuación de velocidad de una reacción de primer orden. Graficando los datos de decaimiento de los radicales N-óxido obtuvimos una línea recta cuya pendiente nos entregó la pseudoconstante de velocidad k_1 . Los derivados de la Fenazina di-N-óxido siguen entonces un decaimiento de primer orden ilustrado por la ecuación 3.2 en el cual se propone como decaimiento la liberación del radical $\cdot\text{OH}$.

Tabla 3.6: Tiempos de vida media [min] y constantes de decaimiento k_1 [s^{-1}] y k_2 [$M^{-1}s^{-1}$] de $\cdot RNO_x$

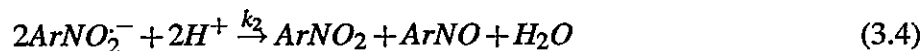
| compuestos | $t_{1/2}(min)$ | k_1, k_2 |
|------------|----------------|----------------------|
| NS1 | 2.62 | $1.34 \cdot 10^{-1}$ |
| NS2 | 43.02 | $6.20 \cdot 10^{-3}$ |
| NS3 | 3.21 | $5.90 \cdot 10^{-2}$ |
| NS4 | 149.40 | $1.80 \cdot 10^{-3}$ |
| NS5 | 2.11 | $9.88 \cdot 10^{-2}$ |
| NS6 | 10.96 | $1.80 \cdot 10^{-2}$ |
| NS7 | 19.63 | $1.32 \cdot 10^{-2}$ |
| NS8 | 46.42 | $6.00 \cdot 10^{-3}$ |
| ML14 | 288.81 | $4.00 \cdot 10^{-5}$ |
| ML15 | 97.63 | $7.10 \cdot 10^{-3}$ |
| ML18 | 577.62 | $1.20 \cdot 10^{-3}$ |
| ML19 | 66.65 | $1.04 \cdot 10^{-2}$ |
| ML44 | 770.16 | $9.00 \cdot 10^{-4}$ |
| ML45 | 11.55 | $1.00 \cdot 10^{-3}$ |
| ML01 | ND | ND |

$$\ln[rad] = k_1 t + \ln[rad]_0 \quad (3.1)$$



La ecuación 3.3 se obtiene de la integración de una ecuación de velocidad de segundo orden. De la pendiente de la línea recta que surge del ajuste de los datos de los nitrofuranos a esta ecuación se obtiene la pseudoconstante de decaimiento de segundo orden k_2 .

$$\frac{1}{[rad]} = -k_2 t + \frac{1}{[rad]_0} \quad (3.3)$$



La ecuación 3.4 da cuenta de la reacción de disproporción que sufren los nitrofuranos al descomponerse. La tabla 3.6 muestra los valores de tiempos de vida media y constantes de decaimiento de los radicales $\cdot RNO_x$. La figura 3.10 muestra los valores de las constantes de decaimiento de los

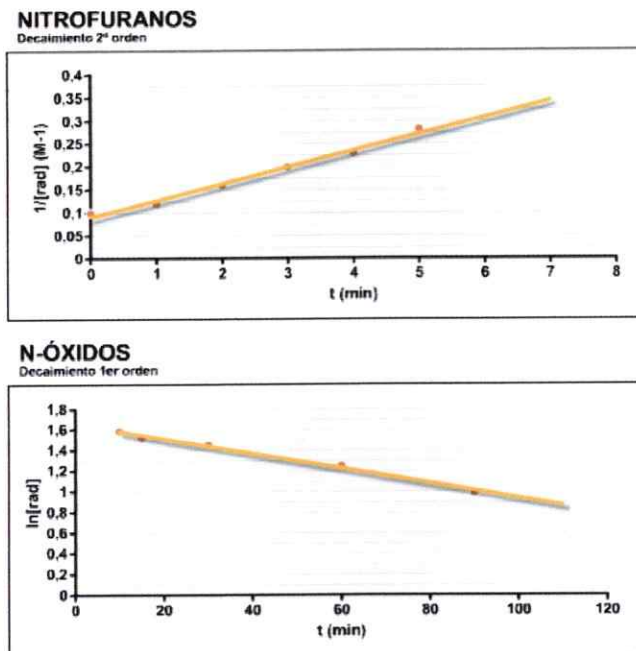


Figura 3.9: Velocidades de decaimiento para nitrofuranos (NS3) y N-óxidos (ML19).

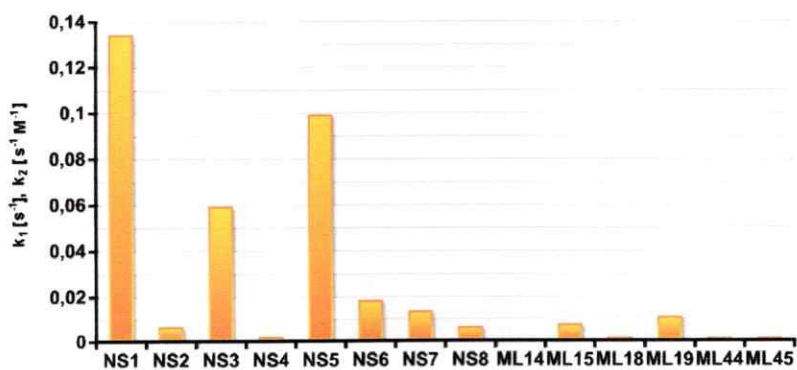


Figura 3.10: Constantes de decaimiento para los radicales de nitrofuranos y N-óxidos.

$\cdot\text{RNO}_x$. Se puede apreciar que en general se trata de compuestos que generan radicales estables cuyos tiempos de vida, como observamos en la figura 3.9, fluctúan entre los 60 min, el más reactivo, y 500 min el más estable. Los nitrofuranos de cadena corta son notoriamente más reactivos, con tiempos de vida media no superiores a los 20 minutos (NS7). Estos resultados concuerdan con los obtenidos acerca de la reactividad de los nitrofuranos frente a radicales libres, sobre todo en lo que concierne al radical DPPH, con el que se aprecia una mayor actividad "apagadora" por parte de los compuestos de cadena larga, debido a que el radical $\text{RNO}_2^{\cdot-}$ formado a partir de su interacción con el radical DPPH es mucho más estable. Puesto que a producto estable, reactante reactivo, el comportamiento de estos compuestos se muestra consistente.

Hemos visto en esta sección que los nitrofuranos no muestran grandes diferencias en cuanto su reactividad frente a radicales libres que se deban a la variabilidad de sus sustituyentes. Sí comprobamos que el largo de cadena afecta más, sobre todo en lo que a decaimiento se refiere, donde claramente los derivados de cadena larga se muestran más estables que los de cadena corta. En cuanto a los N-óxidos, vimos que los sustituyentes sí influyen en su reactividad. Los derivados con grupos atradores de electrones se mostraron menos activos que el resto. La figura 3.11 entrega una explicación a este comportamiento. En ella se muestra el porcentaje de sobrevivencia de células cancerosas V-79 en presencia de nuestros derivados de N-óxidos, reportado por Cerecetto y col. [54], y las reactividades de estos compuestos mostradas un poco más arriba, en función de los potenciales de peak catódico, presentados en el estudio electroquímico. Podemos apreciar un rango de potenciales óptimo entre -0.9 y -1.0 V en el que ocurre el mínimo de sobrevivencia de células cancerosas, y como este mínimo concuerda con el máximo de "actividad antioxidante". Este comportamiento se observa muy bien para la interacción con el radical superóxido, en menor grado para

el radical DPPH, y prácticamente nada para el radical hidroxilo debido a la ya explicada inmensa reactividad. Con estos resultados, se aclara el concepto de que a potenciales de reducción menos negativos se logra una mayor actividad, y aparece un rango de potenciales en que los compuestos logran actividades óptimas.

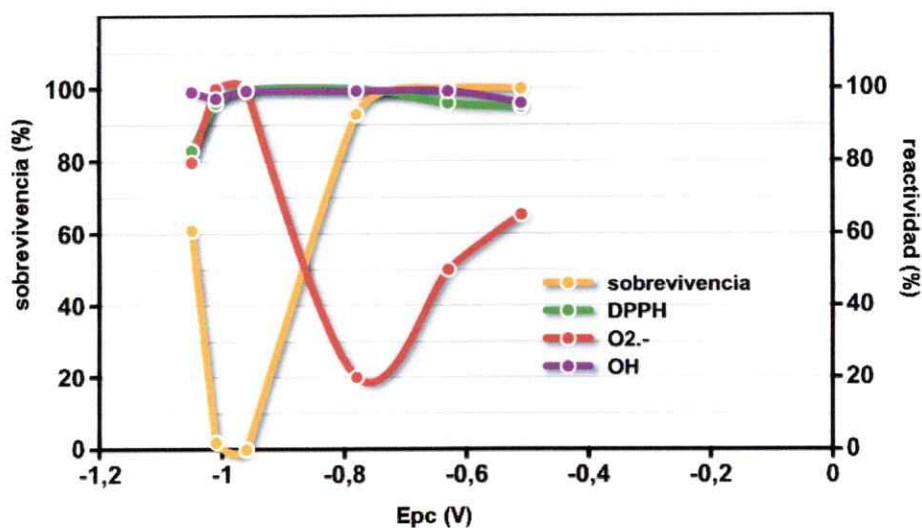


Figura 3.11: Reactividades de N-óxidos en función del Epc.

3.4. Estudio Microsomal

Las drogas que involucran la generación de radicales libres en el mecanismo de acción disponibles para el tratamiento de enfermedades parasitarias generalmente provocan graves efectos secundarios en el paciente que obligan a interrumpir el tratamiento, dejando a la enfermedad sin cura efectiva. Bajo esta perspectiva es que surge la necesidad de encontrar drogas menos tóxicas.

En Chile la enfermedad parasitaria más común, dentro de lo que a enfermedades parasitarias se refiere, es la enfermedad de Chagas. A pesar de que se ha logrado erradicar el vector de esta enfermedad en territorio chileno, existe todavía un número importante de personas infectadas. A nivel mundial la cifra de infectados asciende a más de 16 millones de personas.

Henderson y col. [11] llevaron a cabo un estudio donde correlacionaron la actividad tripanosomícida de un grupo de nitrofuranos con su capacidad de actuar como sustratos de la enzima tripanotión reductasa, en condiciones aeróbicas. Éstos mostraron una menor eficiencia como sustratos de esta enzima que el mismo tripanotión (**Fig. 1.1**). Sin embargo, lograron correlacionar las velocidades relativas de reducción (por la enzima) de esos compuestos con las características estructurales diseñadas para generar el enlace entre estos compuestos y el sitio activo de la enzima. Como hemos visto hasta ahora, dentro de su diseño, estos posibles fármacos fueron provistos de sustituyentes dadores o aceptores de electrones para obtener una variabilidad de actividad biológica. En general, la presencia de sustituyentes aceptores de electrones debiera mejorar la actividad citotóxica de los distintos derivados debido a la capacidad de estabilizar los radicales generados. Puesto que los microorganismos responsables de las enfermedades parasitarias generalmente son muy sensibles a las ERO, se realizaron ensayos biológicos para determinar si ocurre su generación a partir de la reducción enzimática de los compuestos en estudio. En una primera aproximación para identificar

los mecanismos moleculares de acción tripanocida de estas series de compuestos se evaluó su actividad como agentes causantes de estrés oxidativo sobre las células de *T. cruzi*, y seguidamente en microsomas provenientes de hígado de rata, por medio de la medición por espectroscopía RPE de las ERO generadas.

3.4.1. Microsomas de *Trypanosoma cruzi*

Se midió la capacidad de generar radicales libres en medios microsomales de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* bajo las condiciones establecidas en la sección 2.9.

La figura 3.12 muestra varios espectros que permiten comparar diferentes comportamientos de los compuestos en presencia de microsomas de *T. cruzi* y de hígado de rata. El espectro (E) muestra el patrón de señales de cuatro líneas con constantes $a_H = a_N = 14.69$ G característico del aducto DMPO-OH \cdot , cuando el nitrofurano NS3 se encuentra en presencia de microsomas de *T. cruzi*, lo que evidencia la formación de ERO cuando el radical nitro es generado por reducción biológica en un ambiente aeróbico. La tabla 3.7 presenta las intensidades de las señales DMPO-OH \cdot de los espectros RPE obtenidas a partir de los compuestos RNO $_x$ en presencia de *T. cruzi*.

Se detectó la presencia del aducto DMPO-OH \cdot por parte de todos los derivados del nitrofurano lo que indica la generación de ERO cuando estos compuestos son reducidos en medios biológicos en presencia de oxígeno. El nitrofurano que más cantidad de radical hidroxilo generó fue NS3, compuesto de cadena corta con R = Fenilo. En el caso de los N-óxidos, los únicos que compuestos que lograron generar ERO fueron ML14 (R = CH $_3$, X = NH $_2$) y ML44 (R = H, X = NH $_2$), equivalentes a los compuestos con sustituyentes dadores de electrones, lo que contrasta con lo esperado, y con el resultado de los nitrofuranos, donde el más activo posee como sustituyente un grupo aceptor de electrones.

Tabla 3.7: Intensidades de las señales RPE del radical aducto DMPO-OH

| <i>compuestos</i> | <i>I T.cruzi</i> | <i>I mamifero</i> |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| NS1 | 0.5 10 ³ | 0.0 |
| NS2 | 1.1 10 ³ | 0.0 |
| NS3 | 3.0 10 ³ | 8.1 10 ³ |
| NS4 | 2.8 10 ³ | 0.0 |
| NS5 | 1.7 10 ³ | 0.0 |
| NS6 | 1.6 10 ³ | 0.0 |
| NS7 | 1.3 10 ³ | 0.0 |
| NS8 | 1.5 10 ³ | 0.0 |
| ML14 | 1.7 10 ³ | 0.0 |
| ML15 | 0.0 | 0.0 |
| ML18 | 0.0 | 0.0 |
| ML19 | 0.0 | 0.0 |
| ML44 | 2.0 10 ³ | 0.0 |
| ML45 | 0.0 | 0.0 |
| ML01 | 0.0 | 0.0 |

3.4.2. Microsomas de mamífero

La tabla 3.7 muestra también las intensidades de señal de los RNOx en presencia de microsomas mamíferos. El único nitrofurano que generó señal fue NS3, con lo que comprobamos su alta reactividad, y el comportamiento interesante del resto de los compuestos, que no actuaron de igual manera frente a microsomas mamíferos o parasitarios. La capacidad de generar cantidades no menospreciables de radicales en presencia de epimastigote de *T. cruzi* y de no generar nada en presencia de microsomas mamíferos, hablaría de las diferentes capacidades de reducirse en los diferentes medios, sugiriendo selectividad por un medio sobre el otro. El mecanismo de reducción de estos compuestos, que son reducidos en medios tripanosomales e inactivos en medios mamíferos, podrían ser formar parte de un mecanismo de reducción que involucra la inhibición de las enzimas responsables de la protección parasitaria sin afectar al sistema glutatión reductasa/glutatión peroxidasa responsable de la protección mamífera. La familia de N-óxidos generó en algunos de sus derivados lo que pareciera ser el atrapamiento del radical hidroxilo, pero en cantidades no cuantificables, presentando los espectros señales que se confunden con el ruido.

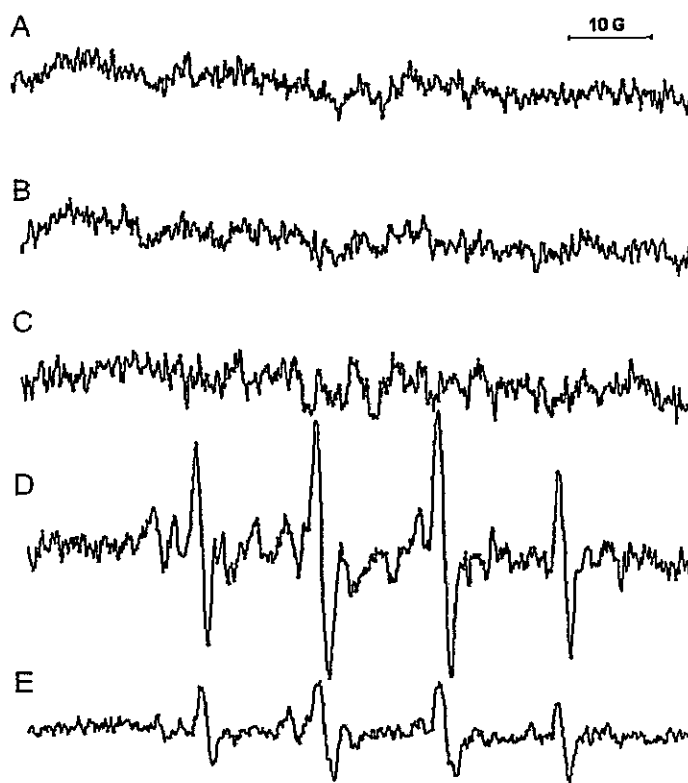


Figura 3.12: Espectros RPE de (A) microsomas de hígado de rata 1.5 mg de proteína/ml, DMPO 100 mM; (B) igual que (A) en presencia de NS3 1 mM y en ausencia de microsomas; (C) igual que (A) en presencia de NS6 1 mM; (D) igual que (A) en presencia de NS3 1 mM; (E) microsomas de *T. cruzi* 8 mg de proteína/ml, DMPO 100mM, NS3 1 mM

3.5. Estudio Fotoquímico:

Compuestos fotosensibles como las hipocrelinas han mostrado una acción fotodinámica eficiente contra algunos virus, incluido el VIH, células tumorales malignas y tumores sólidos. Sin embargo estos compuestos absorben radiación a longitudes de onda que se encuentran fuera de los que se conoce como ventana fototerapéutica (650-950 nm). La ventana fototerapéutica es la región de longitudes de ondas a las cuales el tejido vivo es prácticamente transparente y no corre riesgo de sufrir daños irreversibles.

La generación de aniones radicales en ausencia de oxígeno y de ERO, como $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ ó 1O_2 ,

en presencia de él juega un rol importante en la eliminación inducida de tumores malignos, y es usada regularmente en las radioterapias contra el cáncer. Esta sección fue realizada para comprobar si los derivados de RNO_x son capaces de generar radicales libres al ser irradiados con luz UV-Vis, en presencia y ausencia de O₂, en presencia y ausencia de Spin Trap. En primer lugar se irradiaron soluciones de los compuestos en estudio en DMSO, en presencia del spin probe 3-carboxipropil. Se registraron espectros de una solución de spin probe bajo condiciones de iluminación normales y al ser irradiada durante 2, 5 y 10 minutos para comprobar el efecto de la luz sobre la muestra control. Bajo estas condiciones se observó un aumento de la intensidad de la señal del spin probe en presencia de N-óxido. En el caso de una interacción de radicales generados por la irradiación de la muestra con el spin probe, el resultado esperado es una disminución de la intensidad de la señal del spin probe. Para determinar la razón del aumento de esta señal, se irradiaron muestras de N-óxido en DMSO durante 2 minutos, obteniéndose espectros RPE como el mostrado en la figura 3.13.

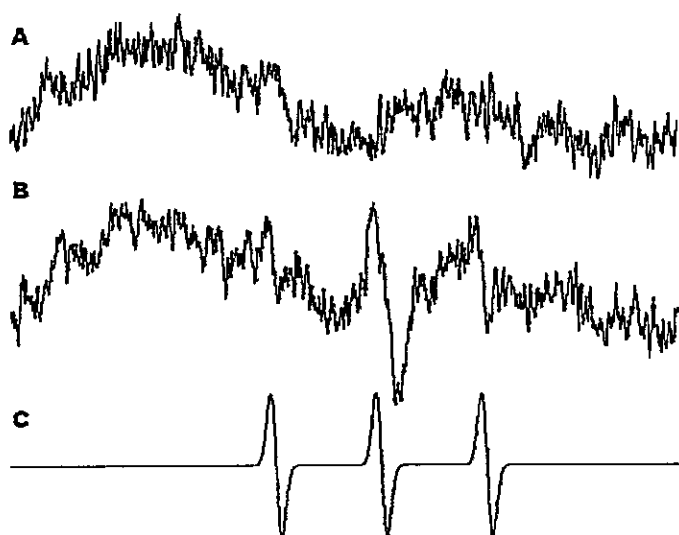


Figura 3.13: Espectro RPE al irradiar una solución de (A) DMSO; (B) ML15 2 mM en DMSO. (C) simulación de (B).

Este espectro de tres líneas, con una constante de acoplamiento de $a = 14.67$ G es el resultado de la generación de un radical a partir del compuesto ML15. Lo que observamos en el espectro es el acoplamiento de un electrón con un nitrógeno, que al ser muy parecido al acoplamiento observado con el spin probe, provocaba una superposición de líneas, y por lo tanto un aumento en la intensidad de la señal. El mismo comportamiento se observó para los compuestos ML19 y ML45, ambos compuestos, al igual que ML15, con OH como sustituyente. Ninguno de los demás N-óxidos generó señal de RPE.

No se observó generación de ninguna especie radicalaria debido a la irradiación de nitrofurano, bajo estas condiciones, ni en presencia de spin probe ni en su ausencia.

3.6. Estudio Teórico

En esta sección presentamos los datos más relevantes sobre las geometrías obtenidas de las optimizaciones realizadas a las dos familias en estudio en sus formas neutras y radicalarias usando las metodologías AM1 y B3LYP, a modo de poder compararlas entre ellas y concluir sobre la más apropiada. Posteriormente se realizaron los cálculos de las propiedades fisicoquímicas que mejor describen su reactividad. Los datos teóricos fueron comparados con los potenciales de reducción y las constantes de acoplamiento hiperfino experimentales.

3.6.1. Nitrofuranos de Tiosemicarbazona

Puesto que las estructuras de los nitrofuranos ofrecen varios ángulos diedros cuya rotación deriva en numerosas conformaciones, se realizó una búsqueda conformacional de las diez estructuras más estables definiendo 6 ángulos diedros como ángulos de torsión variable. Para verificar la validez de las geometrías elegidas dentro de las más estables obtenidas durante la exploración

conformacional se designaron algunos elementos estructurales los cuales fueron comparados con datos obtenidos de la bibliografía (**Fig. 3.14**). Por otro lado se comparan algunos ángulos diedros representativos de las diferentes conformaciones más estables de las moléculas.

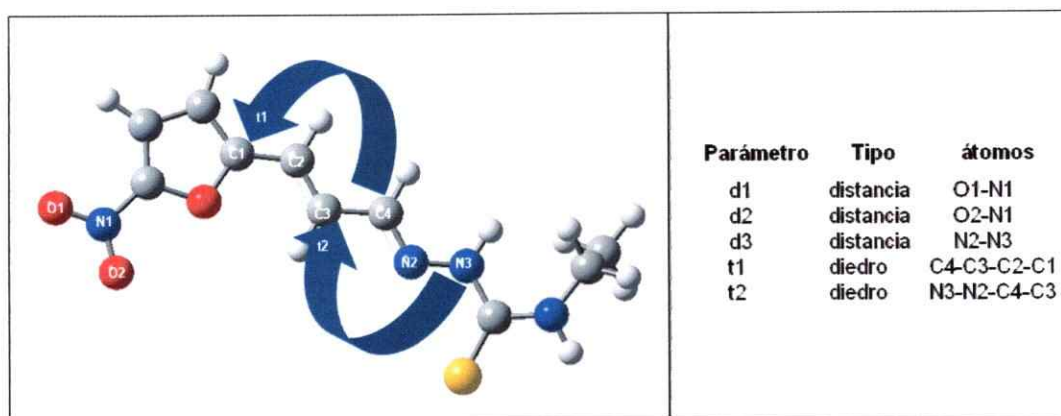


Figura 3.14: Distancias y ángulos diedros representativos en las conformaciones resultantes del análisis conformacional

La elección de las conformaciones fue realizada usando como propiedad fisicoquímica patrón experimental a las constantes de acoplamiento hiperfino obtenidas de los espectros RPE de los radicales formados electroquímicamente (tabla 3.3), ignorando en algunos casos conformaciones más estables que no reproducían las constantes de acoplamiento experimentales. El estudio conformacional mostró una clara tendencia de los nitrofuranos "cortos" (NS1, NS3, NS5 Y NS7) a adoptar una conformación plegada donde la presencia de puentes de hidrógeno estabiliza la estructura y permite un mayor equilibrio entre las formas radicalarias protonada ($\text{RNO}_2\text{H}^\cdot$) y sin protonar ($\text{RNO}_2^{\cdot-}$), pues vimos en el estudio electroquímico que el grupo nitro se encontraba protonado en parte de las moléculas debido a la acidez del hidrógeno carbazónico. Asimismo los nitrofuranos "largos" tienden a adoptar una conformación más extendida que permite una mayor deslocalización de la densidad de espín y por ende permite un aumento en la densidad electrónica de los núcleos de la cadena (**Fig. 3.15**).

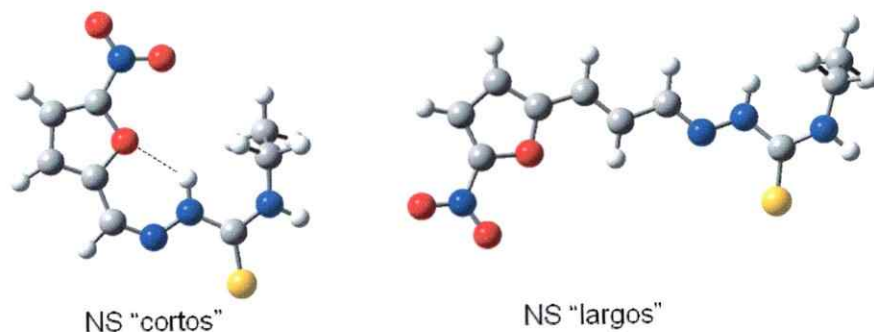


Figura 3.15: Conformaciones adoptadas por los derivados "cortos" y "largos"

La tabla 3.8 muestra las distancias d_1 , d_2 y d_3 , y los ángulos diedros t_1 y t_2 , descritos en la figura **Fig. 3.14**, calculados mediante las metodologías AM1 y B3LYP/6-31G*, de las conformaciones que mejor se ajustaron a los datos experimentales obtenidos por RPE (tabla 3.3) y que mejor reprodujeron los espectros experimentales (**Fig. 3.6**). Estos resultados fueron comparados con datos cristalográficos de estructuras similares [81, 82]. El análisis de estos resultados señala que el método semiempírico subestima las distancias d_1 , d_2 y d_3 arrojando un valor de 1.20 Å respecto de los datos cristalográficos, mientras que B3LYP los reproduce adecuadamente con un valor ~ 1.23 Å para d_1 y d_2 , y de ~ 1.34 Å para d_3 . Esto nos indica que el método DFT describe mejor el sistema conjugado de las moléculas lo que es una de las debilidades de AM1.

Tabla 3.8: Optimización de geometrías de las conformaciones neutras más estables de los nitrofuranos de tiosemicarbazonas

| molécula | $d_1/\text{Å}$ | | $d_2/\text{Å}$ | | $d_3/\text{Å}$ | | $t_1/^\circ$ | | $t_2/^\circ$ | |
|-------------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|--------------|--------|--------------|--------|
| | AM1 | B3LYP | AM1 | B3LYP | AM1 | B3LYP | AM1 | B3LYP | AM1 | B3LYP |
| NS1 | 1.20 | 1.23 | 1.20 | 1.24 | 1.32 | 1.34 | - | - | -1.9 | -0.32 |
| NS2 | 1.20 | 1.23 | 1.20 | 1.24 | 1.33 | 1.35 | 180.1 | 179.8 | 182.7 | -181.1 |
| NS3 | 1.20 | 1.23 | 1.20 | 1.24 | 1.32 | 1.34 | - | - | 0.0 | 1.9 |
| NS4 | 1.20 | 1.23 | 1.20 | 1.24 | 1.32 | 1.34 | 180.0 | -180.0 | -180.1 | -180.0 |
| NS5 | 1.20 | 1.23 | 1.20 | 1.24 | 1.32 | 1.33 | - | - | 0.0 | 0.0 |
| NS6 | 1.20 | 1.23 | 1.20 | 1.24 | 1.33 | 1.35 | 2.5 | 0.0 | 177.8 | 180.0 |
| NS7 | 1.20 | 1.23 | 1.20 | 1.24 | 1.32 | 1.34 | - | - | -180.0 | -180.0 |
| NS8 | 1.20 | 1.23 | 1.20 | 1.24 | 1.33 | 1.34 | -180.0 | -180.0 | 176.8 | 179.1 |
| nitrofurano | 1.23 | | 1.23 | | - | | - | | - | |

Se aprecia asimismo una mayor tendencia de B3LYP a favorecer la planaridad de la cadena lateral de estas estructuras colaborando con la conjugación del sistema. Observando los valores

arrojados por ambas metodologías nos percatamos de las distintas conformaciones que adoptan las estructuras "cortas" y "largas" plegándose para favorecer la formación de enlaces de hidrógeno y extendiéndose favoreciendo la deslocalización de la densidad electrónica del sistema respectivamente. El cálculo realizado para el compuesto NS6 no se correlaciona con el resto, sin embargo como mostramos en la figura 3.6 arrojó constantes de acoplamiento que generaron un espectro simulado prácticamente idéntico al experimental, por lo que la conformación fue conservada. A continuación presentamos los resultados de las optimizaciones de las geometrías de las moléculas radicalarias de esta familia de nitrofuranos (Tabla 3.9), para las cuales se utilizaron las mismas metodologías (en su forma no restringida) que para las moléculas neutras. El análisis de estos

Tabla 3.9: Optimización de geometrías de las conformaciones radicalarias más estables de los nitrofuranos de tiosemicarbazonas

| molécula | $d_1/\text{Å}$ | | $d_2/\text{Å}$ | | $d_3/\text{Å}$ | | $\tau_1/^\circ$ | | $\tau_2/^\circ$ | |
|-------------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| | UAM1 | UB3LYP | UAM1 | UB3LYP | UAM1 | UB3LYP | UAM1 | UB3LYP | UAM1 | UB3LYP |
| NS1 | 1.20 | 1.28 | 1.20 | 1.27 | 1.32 | 1.37 | - | - | -1.9 | 0.0 |
| NS2 | 1.20 | 1.27 | 1.20 | 1.26 | 1.33 | 1.37 | 180.1 | 179.5 | 182.7 | -181.5 |
| NS3 | 1.20 | 1.27 | 1.20 | 1.28 | 1.32 | 1.37 | - | - | 0.0 | 3.2 |
| NS4 | 1.20 | 1.26 | 1.20 | 1.26 | 1.32 | 1.37 | 180.0 | 180.0 | -180.1 | -180.0 |
| NS5 | 1.20 | 1.28 | 1.20 | 1.28 | 1.32 | 1.37 | - | - | 0.0 | 0.0 |
| NS6 | 1.20 | 1.26 | 1.20 | 1.26 | 1.33 | 1.37 | 2.5 | -179.7 | 177.8 | 179.1 |
| NS7 | 1.20 | 1.26 | 1.20 | 1.27 | 1.32 | 1.37 | - | - | -180.0 | -180.0 |
| NS8 | 1.20 | 1.27 | 1.20 | 1.26 | 1.33 | 1.37 | -180.0 | -0.2 | 176.8 | 179.2 |
| nitrofurano | 1.23 | | 1.23 | | - | | - | | - | |

resultados señala que el método semiempírico arroja de nuevo distancias de enlace menores que UB3LYP con un valor de ~ 1.21 Å para d_1 y d_2 , y ~ 1.34 Å para d_3 , frente a ~ 1.27 Å, para d_1 y d_2 , y 1.37 Å para d_3 calculadas por UB3LYP. El aumento notorio en las distancias de enlace en el grupo nitro por parte de UB3LYP se debe a que el electrón desapareado tiende a deslocalizar la densidad electrónica al resto de la molécula aumentando así el carácter simple de los enlaces NO. En cuanto a los ángulos diedros se observa una pérdida de la planaridad en los resultados arrojados por el método UAM1, no así con UB3LYP confirmando los problemas que presentan en general los métodos semiempíricos para describir correctamente las geometrías radicalarias. Con estos antecedentes podemos concluir que las moléculas optimizadas por DFT son las más adecuadas para

el cálculo de las propiedades electrónicas. Considerando las dos conformaciones más probables en las que se encuentra este tipo de moléculas, nos preguntamos si éstas coexisten en equilibrio, o si definitivamente una se encuentra con mayor probabilidad que la otra. Para ello calculamos las energías de las moléculas realizando un barrido del ángulo dihedro que más afecta a su conformación, dejando el resto de las variables de la geometría constantes [83]. El ángulo dihedro (NNCN)

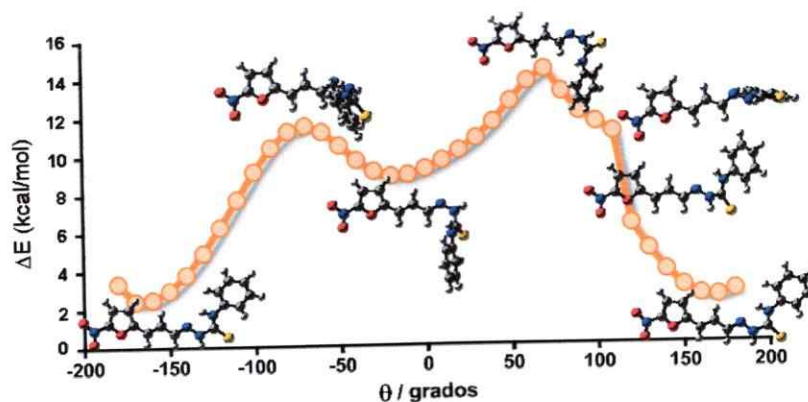


Figura 3.16: Superficie de potencial en función del barrido del ángulo θ para NS4

escogido por la posibilidad que ofrece de cambiar la conformación de las moléculas de plegada a extendida (**Fig. 3.15**). Encontramos que para pasar de una conformación a la otra, estas moléculas deben pasar una barrera de aproximadamente 10 kcal/mol (**Fig. 3.16**), lo que corresponde a la ruptura del puente de hidrógeno estabilizador de la conformación plegada. Por lo tanto, los compuestos "cortos" se encuentran con mayor probabilidad como conformeros plegados, mientras que los compuestos "largos" se encuentran más probablemente como conformeros extendidos [83].

La figura **3.17** muestra las correlaciones entre Afinidad Electrónica experimental, calculada con la diferencia entre las energías de la forma neutra y la forma radicalaria, la Electroafinidad teórica expresada en términos del negativo de la energía del orbital LUMO ($-\epsilon_{LUMO}$) y la electrofilia (ω) para verificar sus comportamientos en función de los potenciales de peak catódicos experi-

mentales. Se encontró que sus correlaciones que fueron de 0.67, 0.76 y de 0.73 respectivamente. Según estas correlaciones, advertimos una dependencia entre las propiedades electrónicas calculadas y los potenciales de reducción de los nitrofuranos. Se puede apreciar que la Electroafinidad experimental presenta una tendencia esperada a aumentar mientras aumenta el potencial de reducción de las moléculas, o sea, mientras la molécula se reduce más fácilmente al estar más ávida a aceptar electrones. El mismo comportamiento, aunque mucho más marcado, se aprecia respecto de la Electroafinidad teórica reproduciendo adecuadamente los datos experimentales. La electrofilia, que representa la capacidad de la molécula de reaccionar con un compuesto dador de electrones (o electrófilo) mantiene el mismo comportamiento acorde a las variaciones en los potenciales de reducción, aumentando al hacerse menos negativo el potencial de reducción, denotando mayor demanda de electrones.

Se calcularon además las funciones de Fukui condensadas a partir de las cargas atómicas de Mulliken de las formas con N y N+1 electrones. Al compararlas con las constantes de acoplamiento, aquellas de mayor valor que representan donde se encuentra el electrón desapareado, los datos se muestran muy concordantes y respecto a las zonas reactivas de las moléculas. La figura 3.18 muestra la reactividad local de molécula NS3 a través de las funciones de Fukui condensadas f_K^+ , siendo los oxígenos del grupo nitro, el azufre y uno de los nitrógenos semicarbazónicos los centros más reactivos frente al ataque de un electrón. El mapa de la densidad de espín mostrado en la figura 3.19, que muestra la localización de la densidad de espín (o localización del electrón desapareado) localiza en esas mismas regiones, dejando evidencia de la consistencia de los cálculos teóricos. Observamos que la localización del orbital LUMO guarda la misma tendencia que la función de

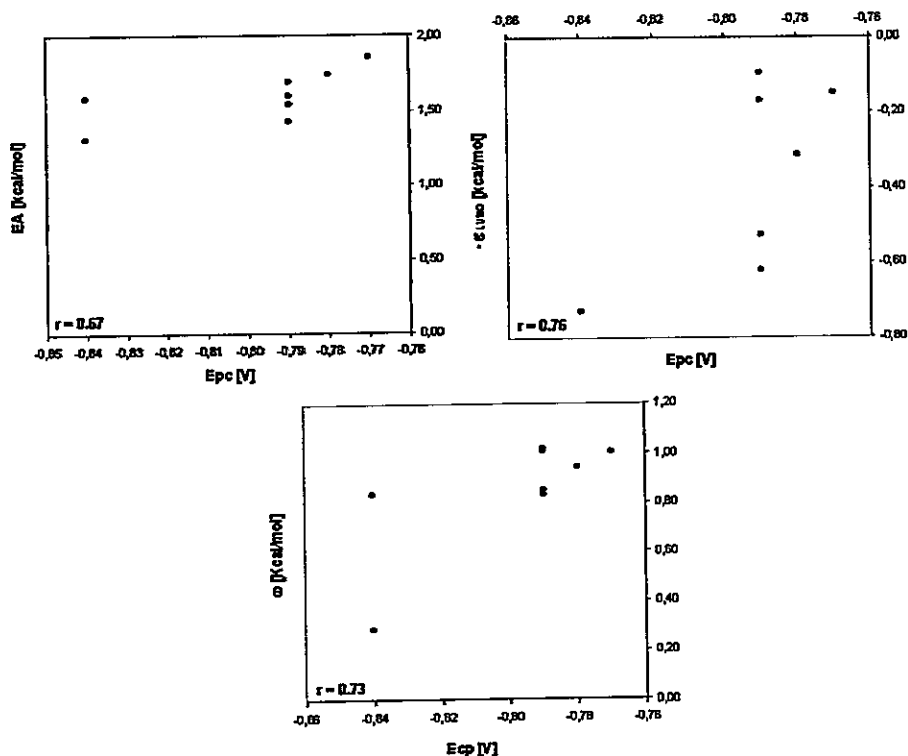


Figura 3.17: Correlaciones obtenidas entre AE, $-\epsilon_{LUMO}$ y ω vs E_{pc} para las moléculas derivadas del nitrofurano

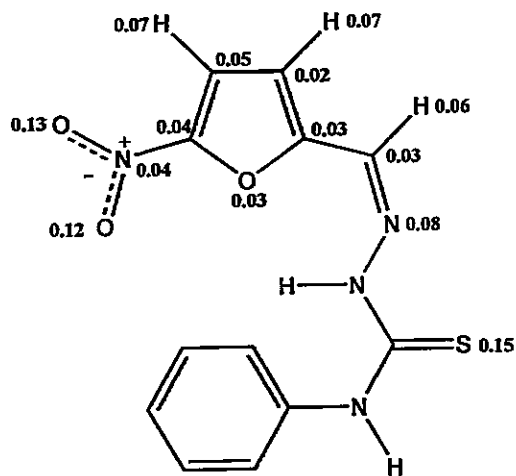


Figura 3.18: Funciones de Fukui Condensadas f_K^+ del nitrofurano NS3

Fukui calculada a partir de las moléculas con N y N+1 electrones, por lo que se deduce la posibilidad de calcular esta última a partir de la densidad electrónica en el orbital LUMO, ahorrando así

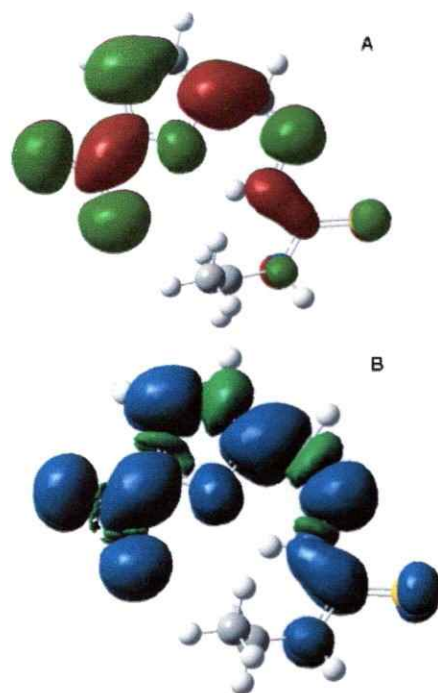


Figura 3.19: Mapas de Orbital LUMO (A) y Densidad de Espín (B) sobre la estructura del compuesto NS1

tiempo en el cálculo.

3.6.2. Di-N-óxidos de Fenazina

En el caso de los di-N-óxidos no fue necesario realizar una exploración conformacional previa a las optimizaciones de geometrías y los cálculos de propiedades electrónicas, puesto que existe una sola conformación posible. Para verificar la validez de las optimizaciones se designaron algunos elementos estructurales los cuales fueron comparados con datos obtenidos de la bibliografía (**Fig. 3.20**). Por otro lado se compararon algunos ángulos diedros representativos de las diferentes conformaciones más estables de las moléculas.

Los resultados mostrados en la tabla 3.10 obtenidos por las metodologías AM1 y B3LYP/6-31G* son comparados con datos cristalográficos de estructuras similares [84]. El análisis de estos

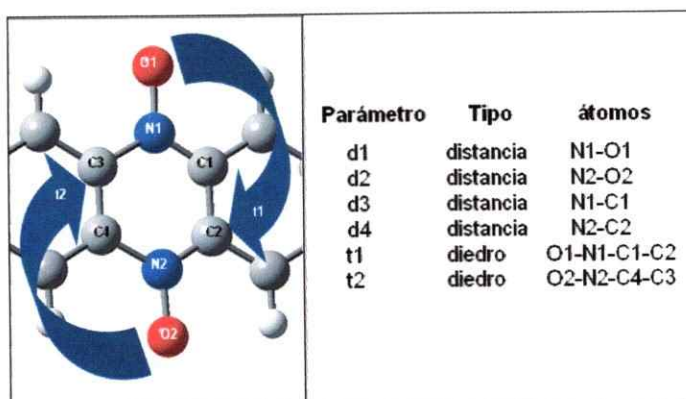


Figura 3.20: Distancias y ángulos diedros representativos en las estructuras de di-N-óxidos de fenazina

Tabla 3.10: Optimización de geometrías de las moléculas neutras de los di-N-óxidos de fenazina

| molécula | $d_1/\text{Å}$ | | $d_2/\text{Å}$ | | $d_3/\text{Å}$ | | $d_4/\text{Å}$ | | $t_1/^\circ$ | | $t_2/^\circ$ | |
|------------------------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|--------------|--------|--------------|--------|
| | AM1 | B3LYP | AM1 | B3LYP | AM1 | B3LYP | AM1 | B3LYP | AM1 | B3LYP | AM1 | B3LYP |
| ML14 | 1.22 | 1.28 | 1.23 | 1.28 | 1.40 | 1.38 | 1.41 | 1.38 | -179.7 | -180.0 | -179.6 | -179.8 |
| ML15 | 1.22 | 1.28 | 1.23 | 1.28 | 1.40 | 1.38 | 1.40 | 1.38 | -180.0 | -180.0 | 180.0 | 180.0 |
| ML18 | 1.22 | 1.28 | 1.22 | 1.28 | 1.40 | 1.38 | 1.41 | 1.39 | 180.0 | 180.0 | 180.0 | 180.0 |
| ML19 | 1.22 | 1.28 | 1.23 | 1.28 | 1.40 | 1.38 | 1.40 | 1.38 | -180.0 | 180.0 | -180.0 | -180.0 |
| ML44 | 1.22 | 1.28 | 1.23 | 1.28 | 1.40 | 1.38 | 1.40 | 1.38 | 180.0 | 180.0 | 180.0 | 180.0 |
| ML45 | 1.22 | 1.28 | 1.23 | 1.28 | 1.40 | 1.38 | 1.40 | 1.38 | -180.0 | 180.0 | 180.0 | -180.0 |
| ML01 | 1.22 | 1.28 | 1.23 | 1.28 | 1.41 | 1.39 | 1.42 | 1.38 | -179.8 | -179.8 | -179.6 | -179.9 |
| Quinoxalina di-N-óxido | 1.29 | | | | - | | - | | 177.3 | | | |

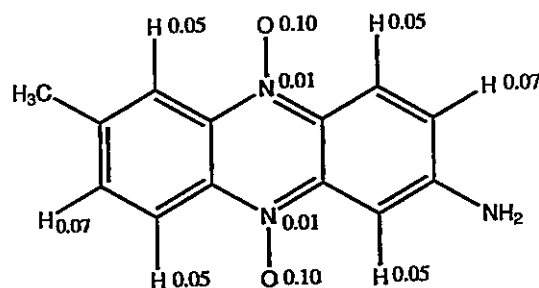
resultados señala que ocurre algo similar a lo observado en las optimizaciones de los nitrofuranos. El método semiempírico subestima los valores de las distancias arrojando un valor de ~ 1.22 Å para d_1 y d_2 respecto de los datos cristalográficos, mientras que B3LYP las representa adecuadamente con valores de ~ 1.28 Å. Esto nos indica que para la optimización de este tipo de estructuras el método semiempírico no describe las estructuras tan bien como la metodología DFT. El cálculo DFT favorece además la planaridad de las moléculas colaborando con la conjugación del sistema. En este aspecto AM1 se desvía ligeramente en el caso de los compuestos ML01 y ML14 con diedros de $\sim 179.6^\circ$, sin embargo, esta puede considerarse normal ya que los datos cristalográficos muestran también una desviación. A continuación presentamos los resultados de las optimizaciones de las geometrías de las formas radicalarias de esta familia de di-N-óxidos de fenazina (tabla 3.11), para las cuales se utilizaron las mismas metodologías que para las moléculas neutras.

Tabla 3.11: Optimización de geometrías de los radicales de los di-N-óxidos de fenazina

| molécula | $d_1/\text{Å}$ | | $d_2/\text{Å}$ | | $d_3/\text{Å}$ | | $d_4/\text{Å}$ | | $t_1/^\circ$ | | $t_2/^\circ$ | |
|------------------------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| | UAMI | UB3LYP | UAMI | UB3LYP | UAMI | UB3LYP | UAMI | UB3LYP | UAMI | UB3LYP | UAMI | UB3LYP |
| ML14 | 1.23 | 1.31 | 1.25 | 1.32 | 1.42 | 1.39 | 1.44 | 1.38 | 178.9 | 179.8 | -169.2 | -179.6 |
| ML15 | 1.23 | 1.31 | 1.24 | 1.32 | 1.44 | 1.39 | 1.39 | 1.38 | -178.3 | 180.0 | 179.6 | -180.0 |
| ML18 | 1.22 | 1.31 | 1.24 | 1.31 | 1.41 | 1.39 | 1.41 | 1.38 | 179.9 | 179.9 | 180.0 | 179.7 |
| ML19 | 1.22 | 1.31 | 1.22 | 1.32 | 1.41 | 1.40 | 1.41 | 1.38 | -179.9 | 180.0 | -180.0 | 180.0 |
| ML44 | 1.23 | 1.31 | 1.25 | 1.32 | 1.410 | 1.39 | 1.41 | 1.38 | 175.6 | 179.9 | 179.6 | 179.7 |
| ML45 | 1.23 | 1.31 | 1.25 | 1.32 | 1.43 | 1.39 | 1.44 | 1.38 | 178.3 | 180.0 | 170.1 | 180.0 |
| ML01 | 1.22 | 1.30 | 1.23 | 1.31 | 1.41 | 1.39 | 1.42 | 1.40 | -179.9 | 179.9 | -179.6 | 179.8 |
| Quinoxalina di-N-óxido | 1.29 | | | | | | | | 177.3 | | | |

El análisis de estos resultados señala que el método semiempírico arroja distancias de enlace similares a las obtenidas de las moléculas neutras. B3LYP arroja valores desde $\sim 1.31 \text{ \AA}$, para d_1 y d_2 , y $\sim 1.39 \text{ \AA}$ para d_3 . En cuanto a los ángulos diedros se observa una pérdida de la planaridad en los resultados arrojados por el método UAM1, confirmando los problemas que presentan en general los métodos semiempíricos para describir correctamente las geometrías radicalarias.

Los coeficientes de correlación obtenidos del resultado de los cálculos realizados a las moléculas de N-óxidos alcanzaron valores de 0.34 (EA vs Epc), 0.10 ($-\epsilon_{LUMO}$ vs Epc) y 0.24(ω) vs Epc (resultados no mostrados), coeficientes demasiado bajos, que no muestran correlación alguna entre los datos teóricos y los experimentales. Ello es debido a que los potenciales de peak catódico son representativos de un proceso redox acoplado a una reacción química, como es propuesto en la sección 3.1.2.

Figura 3.21: Funciones de Fukui Condensadas f_K^+ del nitrofurano ML14

Se calcularon además las funciones de Fukui condensadas a partir de las cargas atómicas de

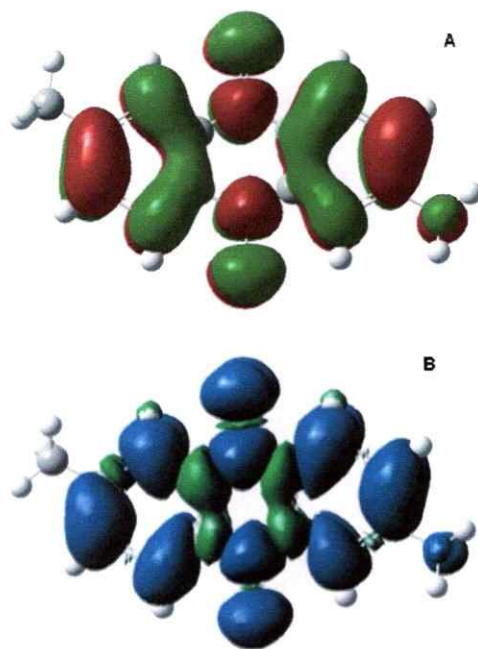


Figura 3.22: Mapas de Orbital LUMO (A) y Densidad de Espín (B) sobre la estructura del compuesto ML14

Mulliken de las formas con N y $N+1$ electrones. Al compararlas con las constantes de acoplamiento, aquellas de mayor valor que representan donde se encuentra el electrón desapareado, los datos se muestran muy concordantes y respecto a las zonas reactivas de las moléculas. Respecto a las funciones de Fukui condensadas f_K^+ calculadas, éstas mostraron que los átomos más reactivos bajo el ataque de un nucleófilo (o de un electrón) son los átomos de oxígeno de los grupos N-óxido, localizando el electrón desapareado en el anillo central como mostró la espectroscopia RPE. Cuando están presentes sustituyentes atractores de electrones como el grupo nitro de ML01 o los cloruros de ML18 y ML19 esta reactividad se reparte entre ellos y los oxígenos de los grupos N-óxido en desmedro del resto de los átomos de la molécula (**Fig. 3.21**). El mapa de la densidad de espín mostrado en la figura **3.22**, que muestra la localización de la densidad de espín (o localización del electrón desapareado) la localiza en esas mismas regiones, dejando evidencia de la autoconsistencia de los cálculos teóricos.

CONCLUSIONES

El estudio electroquímico evidenció la generación de varios intermediarios radicalarios y neutros en el mecanismo de reducción de nitrofuranos y N-óxidos. La familia de nitrofuranos presentó un mecanismo de reducción que involucra un proceso de autoprotonación. En el caso de los N-óxidos, el mecanismo de reducción observado fue Electroquímico-Químico-Electroquímico (ECE).

Las características de los sustituyentes proporcionaron diferencias en los potenciales de peak catódicos de los derivados de la familia de di-N-óxidos. Los compuestos con sustituyentes aceptores de electrones, que ayudan a la estabilización del electrón desapareado, presentaron potenciales menos negativos. Ambas familias presentaron potenciales menores que los de las drogas de uso clínico contra el Chagas y el cáncer, significando una mayor capacidad de generar radicales libres.

El estudio RPE junto con la simulación de espectros y los cálculos teóricos permitió, mediante la determinación de las constantes de acoplamiento experimentales de ambas familias de compuestos, la caracterización de los radicales que participan en su mecanismo de reducción.

La exploración de conformaciones a través de cálculos teóricos indicó dos clases preferibles energéticamente según la presencia de una cadena lateral larga o corta en la familia de los nitrofuranos. Los compuestos con cadena lateral larga encuentran una mejor estabilización en una conformación extendida, en la que el electrón se deslocaliza a lo largo de la cadena. Los compuestos con cadena lateral corta encuentran una mejor estabilización en una conformación plegada, la que se estabiliza mediante la formación de un puente de hidrógeno. Los nitrofuranos de cadena larga presentaron una mayor estabilidad que los de cadena corta, debido a la posibilidad de que el electrón se mueva a lo largo de toda la cadena lateral.

Los radicales de di-N-óxidos de fenazina mostraron, de acuerdo al estudio de tiempos de vida, ser más estables que los nitrofuranos. Esta estabilidad es el resultado de la deslocalización del electrón desapareado entre los átomos que rodean el anillo central.

En cuanto a la capacidad de estos compuestos de apagar radicales libres, los N-óxidos resultaron ser más estables en presencia de grupos atractores de electrones, lo que se aprecia perfectamente en el análisis de su reactividad frente al radical superóxido. La familia de nitrofuranos mostró una diferencia de reactividad en función del largo de su cadena lateral, pero no con respecto de los sustituyentes presentes.

La reactividad frente al radical DPPH no mostró diferencias respecto de los sustituyentes presentes en los N-óxidos. En cuanto a los nitrofuranos, nuevamente mostraron mayor reactividad las conformaciones largas debido a su capacidad de estabilizar el radical resultante.

El radical hidroxilo resultó ser altamente reactivo independiente del compuesto al que se le hizo reaccionar.



El estudio microsomal detectó la generación de radical hidroxilo cuando microsomas de *T. cruzi* se encuentran en presencia de los derivados del nitrofurano. El sustituyente fenilo aumentó la generación de este radical. El radical hidroxilo podría ser causal de la producción de estrés oxidativo en el parásito. Únicamente los derivados con sustituentes dadores de electrones generaron radical hidroxilo en presencia de *T. cruzi*.

En presencia de microsomas de hígado de rata, el único compuesto de las dos familias que generó radical hidroxilo fue el derivado NS3, lo que se podría traducir en una mayor toxicidad.

Los derivados de N-óxidos hidroxilados mostraron ser capaces de generar radicales libres al ser irradiados con luz UV-Vis, lo que los convierte en potenciales fotosensibilizadores. Los demás sustituyentes indujeron la generación de especies radicalarias. No se percibió la generación de radicales fotoquímicamente a partir de los derivados del nitrofurano.

Las propiedades electrónicas calculadas teóricamente mediante metodologías DFT correlacionadas con los potenciales de peak catódicos con coeficientes de correlación aceptables. Sin embargo, los derivados de N-óxidos presentaron coeficientes muy bajos, lo que es debido al acoplamiento de una reacción química en el proceso de transferencia electroquímica.

Las funciones de Fukui electrofílicas condensadas junto con los mapas de orbital LUMO y densidad de espín concordaron con los valores de constantes de acoplamiento experimentales, mostrando ser estas últimas buenos descriptores de reactividad de una molécula frente a especies dadoras de electrones.

En este proyecto hemos podido apreciar la importancia de los grupos o cadenas sustituyentes en el diseño de moléculas con objetivos farmacológicos, ya sea por las características electrónicas o por las posibilidades conformacionales que ofrecen. Además la complementación de los resultados experimentales con cálculos teóricos ofrece consistencia y la posibilidad de una asignación de centros de reactividad locales.

PUBLICACIONES

Durante el periodo de realización y escritura de esta tesis se generaron las siguientes publicaciones:

1. C. Rigol, C. Olea-Azar, F. Mendizábal, R. Briones, H. Cerecetto and M. González. Theoretical Study on 5-Nitrofuryl Thiosemicarbazone Radicals Electronic Properties. Journal of Molecular Structure: THEOCHEM, In Press, Accepted Manuscript, In Press, Corrected Proof, Available online 6 June 2006.
2. Otero L, Vieites M, Boiani L, Denicola A, Rigol C, Opazo L, Olea-Azar C, Maya JD, Morello A, Krauth-Siegel RL, Piro OE, Castellano E, Gonzalez M, Gambino D, Cerecetto H. Novel antitrypanosomal agents based on palladium nitrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets Journal of Medicinal Chemistry 49 (2006) 3322–3331.
3. Gerpe A, Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, Gonzalez M, Olea-Azar C, Rigol C, Maya JD, Morello A, Piro OE, Aran VJ, Azqueta A, de Cerain AL, Monge A, Rojas MA, Yaluff G. Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: Synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. Bioorganic & Medicinal Chemistry 14 (2006) 3467–3480.

4. Claudio Olea-Azar, Hugo Cerecetto, Alejandra Gerpe, Mercedes González, Vicente J. Arán, Carolina Rigol, Lucía Opazo. ESR and Electrochemical Study of 5-Nitroindazole Derivatives with Antiprotozoal Activity. *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 63 (2006) 36–42.
5. C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizábal and R. Briones. Applications of Electron Spin Resonance and Spin Trapping in Tropical Parasitic Diseases. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 6 (2006) 211–220.
6. Carolina Rigol, C. Olea-Azar, Fernando Mendizábal, Lucía Otero, Dinorah Gambino, Mercedes González, Hugo Cerecetto. Electrochemical and ESR study of 5-Nitrofuryl containing Thiosemicarbazones Antiprotozoal Drugs. *Spectrochimica Acta Part A* 61 (2005) 2933–2938.
7. C. Olea-Azar, B. Abarca, E. Norambuena, L. Opazo, C. Rigol, R. Ballesteros and M. Chadlaoui. ESR and electrochemical studies of 2-acylpyridines and 6,6'-diacyl-2,2'-bipyridines. *Spectrochimica Acta Part A* 61 (2005) 2261-2266.
8. C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizabal, H. Cerecetto, R. de Maio, M. Gonzalez, W. Porcal, A. Morello, Y. Repetto and J. D. Maya. Novel Benzo[1,2-c]1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives as Antichagasic Agents: Chemical and Biological Studies. *Letters in Drugs Design & Discovery* 2 (2005) 294–301.
9. Aguirre G., Boiani L., Cerecetto H., Fernández M., González M., Denicola A., Otero L., Gambino D., Rigol C., Olea-Azar C., Faúndez M. In vitro activity and mechanism of action

- against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5 nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (2004) 4885–4893.
10. Olea-Azar C., Rigol C., Opazo L., Morello A., Maya J.D., Repetto Y., Aguirre G., Cerecetto H., Di Maio R., González M., Porcal W. ESR and spin trapping studies of two new potential antitrypanosomal drugs *Journal of the Chilean Chemical Society* 48 (2003) 77–79.

Referencias

- [1] Cap. Justo R. Venereo Gutiérrez. Daño Oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar* 31 (2002) 126–133.
- [2] Koppenol, W.H. The centennial of the Fenton reaction. *Free Radical Biology and Medicine* 15 (1993) 645–651.
- [3] Haber, F. and Weiss, J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London A* 147 (1934) 332–351.
- [4] Salvatore Cuzzocrea, Dennis P. Riley, Achille P. Caputi, and Daniela Salvemini. Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacological Reviews* 53 (2001) 135–159.
- [5] Uma Singh, Ishwarlal Jialal. Oxidative Stress and Atherosclerosis. Artículo n prensa, *Pathophysiology* (2006).
- [6] Marianna Zana, Zoltán Janka and János Kálmán. Oxidative stress: a bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. Artículo n prensa, *Neurobiology of Aging* (2006).
- [7] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160 (2006) 1–40.

- [8] Albala C., Arroyo P. Evaluación de la obesidad en el adulto (Obesity evaluation of the adult). *Revista Chilena de Nutrición* 27 (2000) Supl 1:151–156.
- [9] <http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>.
- [10] Mark R. Ariyanayagam, Alan H. Fairlamb. Ovothiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Molecular & Biochemical Parasitology* 115 (2001) 189–198.
- [11] Graeme B. Henderson, Peter Ulrich, Alan H. Fairlamb, Ian Rosenberg, Miercio Pereira, Michael Sela, and Anthony Cerami. "Subversive" Substrates for the Enzyme Trypanothione Disulfide Reductase: Alternative Approach to Chemotherapy of Chagas Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85 (1988) 5374–5378.
- [12] Graeme B. Henderson, Alan H. Fairlamb, Peter Ulrich, and Anthony Cerami. Substrate Specificity of the Flavoprotein Trypanothione Disulfide Reductase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* 26 (1987) 3023–3027.
- [13] Katja Becker, Leann Tilley, Jonathan L. Vennerstrom, David Roberts, Stephen Rogerson, Hagai Ginsburg. Oxidative stress in malaria parasit-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *International Journal for Parasitology* 34 (2004) 163–189.
- [14] Quintero, B. And Miranda, M. A. Mechanisms of photosensitization induced by drugs: a general survey. *Ars Pharmaceutica* 41 (2000) 27–46.
- [15] Michael P. Barrett, Alan H. Fairlamb, Bernard Rousseau, Gerard Chauvière and Jacques Perié. Uptake of the Nitroimidazole Drug Megazol by African Trypanosomes. *Biochemical Pharmacology* 59 (2000) 615–620.

- [16] Docampo R and Moreno SN. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Reviews of Infectious Diseases* 6 (1984) 223–238.
- [17] Viode C, Bettache N, Cenas N, Krauth-Siegel RL, Chauviere G, Bakalara N, Perie J. Enzymatic Reduction Studies of Nitroheterocycles. *Biochemical Pharmacology* 57 (1999) 549–557.
- [18] Hugo Cerecetto and Mercedes González. N-Oxides as Hypoxia Selective Cytotoxins. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 1 (2001) 219–231.
- [19] J.A. Bautista-Martínez, I. González, M. Aguilar-Martínez. Influence of the acidity level change in aprotic media on the voltammetric behavior of nitrogabacinamamides. *Electrochimica Acta* 49 (2004) 3403–3411.
- [20] J. Carbajo, S. Bollo, L.J. Núñez-Vergara, A. Campero, J.A. Squella. Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 531 (2002) 187–194.
- [21] Olea-Azar C, Rigol C, Mendizabal F, Morello A, Maya JD, Moncada C, Cabrera E, di Maio R, Gonzalez M, Cerecetto H. ESR spin trapping studies of free radicals generated from nitrofurant derivative analogues of nifurtimox by electrochemical and *Trypanosoma cruzi* reduction. *Free Radical Research* 37 (2003) 997–1001.
- [22] Joanne H. Tocher. Reductive Activation of Nitroheterocyclic Compounds. *General Pharmacology* 28 (1997) 485–487.
- [23] Julio A. Urbina. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *Journal of Molecular Medicine* 77 (1999) 332–338.

- [24] H. Cerecetto and M. González, Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2(2002) 1187-213.
- [25] Brian Ganley, Goutam Chowdhury, Jennifer Bhansali, J.Scott Daniels and Kent S.Gates. Redox-Activated, Hypoxia-Selective DNA Cleavage by Quinoxaline 1,4-di-N-Oxide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 9 (2001) 2395-2401.
- [26] Allan Covens, John Blessing, David Bender, Robert Mannel, Mark Morgan. A phase II evaluation of tirapazamine plus cisplatin in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology* 100 (2006) 586-590.
- [27] Yvette M. Delahoussaye, Michael P. Hay, Frederik B. Pruijn, William A. Denny, J. Martin Brown. Improved potency of the hypoxic cytotoxin tirapazamine by DNA-targeting. *Biochemical Pharmacology* 65 (2003) 1807-1815.
- [28] Laurence H. Patterson and Fatai A. Taiwo. Electron Paramagnetic Resonance Spectrometry Evidence for Bioreduction of Tirapazamine to Oxidising Free Radicals Under Anaerobic Conditions. *Biochemical Pharmacology* 60 (2000)1933-1935.
- [29] James H Elwell, Bronwyn G. Siim, James W. Evuns and J. Martin Brown. Adaptation of Human Tumor Cells to Tirapazamine under Aerobic Conditions. *Biochemical Pharmacology* 54 (1997) 249-257.
- [30] Claudio Olea-Azar, Carolina Rigol, Lucía Opazo, Antonio Morello, Juan Diego Maya, Yolanda Repetto, Gabriela Aguirre, Hugo Cerecetto, Rossanna Di Maio, Mercedes González and

- Williams Porcal. ESR and Spin Trapping studies of two new potential antitrypanosomal drugs. *Journal of the Chilean Chemical Society* 48 (2003) 77-79.
- [31] Alejandra Gerpe, Gabriela Aguirre, Lucía Boiani, Hugo Cerecetto, Mercedes González, Claudio Olea-Azar, Carolina Rigol, Juan D. Maya, Antonio Morello, Oscar E. Piro, Vicente J. Arán, Amaia Azqueta, Adela López de Ceráin, Antonio Monge, María Antonieta Rojas and Gloria Yalu. Indazole N-oxide derivatives as antiprotozoal agents: Synthesis, biological evaluation and mechanism of action studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14 (2006) 3467-3480.
- [32] Hugo Cerecetto, Rossanna Di Maio, Mercedes González, Mariela Risso, Patricia Saenz, Gustavo Seoane, Ana Denicola, Gonzalo Peluffo, Celia Quijano, and Claudio Olea-Azar. 1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Antitrypanosomal Drugs: Structure-Activity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry* 42 (1999) 1941-1950.
- [33] Gabriela Aguirre, Hugo Cerecetto, Rossanna Di Maio, Mercedes González, Williams Porcal, Gustavo Seoane, Miguel A. Ortega, Ignacio Aldana, Antonio Monge, Ana Denicola. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-Oxide Derivatives as Potential Antitrypanosomal Drugs. Structure-Activity Relationships. Part II. *Archiv der Pharmazie* 335 (2002) 15-21.
- [34] *Analytical Electrochemistry*, Second Edition. Joseph Wang. Copyright © 2000 Wiley-VCH.
- [35] R. S. Nicholson. Semiempirical Procedure for Measuring with Stationary Electrode Polarography Rates of Chemical Reactions Involving the Product of Electron Transfer. *Analytical Chemistry* 38 (1966) 1406-1406.

- [36] J.A. Weil, J.R. Bolton, J.E. Wertz, *Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications*. John Wiley & Sons. Inc. 1994.
- [37] Rowlands. C. C and Murphy D. M. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, Magnetic resonance, Chemical Applications of EPR*. Elsevier Ltd. 2004, pp. 190–198.
- [38] G. Rosen, B. Britigan, H. Halpern, and S. Pou. *Free Radicals, Biology and Detection by Spin Trapping*, Oxford University Press, 1999.
- [39] <http://www.chm.bris.ac.uk/stdb>.
- [40] José Vidal Gancedo. *Cuarta Escuela de Resonancia Paramagnética Electrónica, Spin Trapping y Spin Labelling*, Apl. 7, 2004.
- [41] Buettner GR. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radical Biology and Medicine* 3 (1987) 259–303.
- [42] D. B. Cook, *Handbook of Computational Quantum Chemistry*, Oxford University Press, New York, 1998.
- [43] A. Szabo and N. S. Ostlund, *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. McGraw-Hill, New York, 1989.
- [44] ST Epstein, *The Variation Method in Quantum Chemistry*. Academic, New York, 1974.
- [45] R. G. Parr and W. Yang, *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. Oxford, New York, 1989.
- [46] R. M. Dreizler and E. K. U. Gross, *Density Functional Theory*. Springer-Verlag, Berlin, 1990.

- [47] W. Koch, M.C. Holthausen, *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, second ed., Wiley-VCH Verlag GMBH, 2001 (Capítulo 11).
- [48] A. D. Becke. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Reviews A* 38 (1988) 3098.
- [49] C. Lee, W. Yang and R. G. Parr. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical Reviews B* 37 (1988) 785–789.
- [50] H. M. McConnell. Indirect Hyperfine Interactions in the Paramagnetic Resonance Spectra of Aromatic Free Radicals. *Journal of Chemical Physics* 24 (1964) 764–766.
- [51] Parr, R. G.; Yang, W. *Journal of the American Chemical Society* 106 (1984) 4049–4050.
- [52] W. Yang, W. J. Mortier. Density Functional Approach to the Frontier-Electron Theory of Chemical Reactivity, *Journal of the American Chemical Society* 108 (1986) 5708–5711.
- [53] G. Aguirre, L. Boiani, H. Cerecetto, M. Fernández, M. González, A. Denicola, L. Otero, D. Gambino, C. Rigol, C. Olea-Azar and M. Faúndez. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12 (2004) 4885–4893.
- [54] Hugo Cerecetto, Mercedes González, Ma Laura Lavaggi, Amaia Azqueta, Adela López de Cerain and Antonio Monge. Phenazine 5,10-Dioxide Derivatives as Hypoxic Selective Cytotoxins. *Journal of Medicinal Chemistry* 48(2005) 21–23.
- [55] Habil. D. Martín, A. Weise, H.-J. Niclas. The Solvent Dimethyl Sulfoxide. *Angewandte Chemie International Edition in English* 6 (2003) 318–334.

- [56] C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizábal and R. Briones. Applications of Electron Spin Resonance and Spin Trapping in Tropical Parasitic Diseases. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 6 (2006) 211–220.
- [57] Rodolfo Briones Jerez. Tesis para optar al título de bioquímico, Universidad de Chile, Santiago 2002.
- [58] Allinger N.L. Conformational analysis 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. *Journal of the American Chemical Society* 99 (1977) 8127–8134.
- [59] David C. Young. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real-World Problems*. Copyright 12001 John Wiley & Sons, Inc.
- [60] Robert G. Parr, László v. Szentpály, and Shubin Liu. Electrophilicity Index. *Journal of the American Chemical Society*. 121 (1999) 1922–1924.
- [61] Diamond L.S. Improved method for the non-axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudin (1903) and *E. histolytica*-like amoebae with trypanosomatids. *Journal of Parasitology* 54 (1968) 715–719.
- [62] Juan Diego Maya, Yolanda Repetto, Moisés Agosín, José Manuel Ojeda, Rowena Tellez, Carlos Gaule, Antonio Morello. Effects of Nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 86 (1997) 101–106.
- [63] María Eugenia Letelier, Ana María Lepe, Mario Faúndez, Julia Salazar, Rigoberto Marín, Paula Aracena, Hernán an Speisky. Possible mechanisms underlying copper-induced damage

- in biological membranes leading to cellular toxicity. *Chemico-Biological Interactions* 151 (2005) 71–82.
- [64] O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A. L. Farr, and U.L. Randall. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 (1951) 265–275.
- [65] Tao Wu, Jianquan Shen, Aimin Song, Shen Chen, Manhua Zhang, Tao Shen. Photodynamic action of amino substituted hypocrellins: EPR studies on the photogenerations of active oxygen and free radical species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 57 (2000) 14–21.
- [66] Yu-Ying He and Li-Jin Jiang. Synthesis and EPR investigations of new aminated hypocrellin derivatives. *Free Radical Biology & Medicine* 28 (2000) 1642–1651.
- [67] Carolina Rigol, C. Olea-Azar, Fernando Mendizábal, Lucía Otero, Dinorah Gambino, Mercedes González, Hugo Cerecetto. *Spectrochimica Acta Part A* 61 (2005) 2933–2938.
- [68] R. Nicholson and I. Shain. Theory of Stationary Electrode Polarography Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Analytical Chemistry* 36 (1964) 706–723.
- [69] C. Olea-Azar, A.M. Atria, F. Mendizabal, R. Di Maio, G. Seoane and H. Cerecetto. Electron spin resonance and cyclic voltammetry studies of nitrofurane and nitrothiophene analogues of nifurtimox. *Spectroscopy Letters*, 31 (1998) 99–109.
- [70] J.A. Bautista-Martínez, I. González and M. Aguilar-Martínez. Influence of the acidity level change in aprotic media on the voltammetric behavior of nitrogabacinamamides. *Electrochimica Acta* 49 (2004) 3403–3411.

- [71] J. Carbajo, S. Bollo, L.J. Núñez-Vergara, A. Campero and J.A. Squella. Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 531 (2002) 187–194.
- [72] G. Kokkinidis and A. Kelaidopoulou. Electrochemical behaviour of nitroindoles: oxidative electropolymerization and reduction of the nitro group of polymerized and non-polymerized 4-nitro and 5-nitroindole. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 414 (1996) 197–208.
- [73] C. Amatore, G. Capobianco, G. Farnia, G. Sandonà, J.M. Savéant, M.G. Severin and E. Vianello. Kinetics and mechanism of self-protonation reactions in organic electrochemical processes. *Journal of the American Chemical Society* 107 (1985) 1815–1824.
- [74] S. Bollo, E. Soto-Bustamante, L.J. Núñez-Vergara and J.A. Squella. Electrochemical study of nitrostilbene derivatives: nitro group as a probe of the push-pull effect. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 492 (2000) 54–62.
- [75] James S. Poole, Christopher M. Hadad, Matthew S. Platz, Zachary P. Fredin, Laura Pickard, Elisa Levya Guerrero, Margarita Kessler, Goutam Chowdhury, Delshanee Kotandeniya and Kent S. Gates. Photochemical Electron Transfer Reactions of Tirapazamine. *Photochemistry and Photobiology* 75 (2002) 339–345.
- [76] Philip W. Crawford, Richard G. Scamehorn, Ulrich Hollstein, Michael D. Ryan And Peter Kovacic. Cyclic voltammetry of phenazines and quinoxalines including mono- and di-N-oxides. Relation to structure and antimicrobial activity. *Chemico-Biological Interactions* 60 (1986) 67–84.

- [77] SN Moreno, RP Mason, and R Docampo. Reduction of nifurtimox and nitrofurantoin to free radical metabolites by rat liver mitochondria. Evidence of an outer membrane-located nitroreductase. *Journal of Biological Chemistry* 259 (1984) 6298–6305.
- [78] Tanekazu Kubota, Koichi Nishikida, Hiroshi Miyazaki, Kouji Iwatani and Yoshiko Oishi. Electron Spin Resonance and Polarographic Studies of the Anion Radicals of Heterocyclic Amine N-Oxides. *Journal of the American Chemical Society* 90 (1968) 5080–5090.
- [79] Andrew J. Kirby, Richard J. Schmidt. The antioxidant activity of Chinese herbs for eczema and of placebo herbs. *Journal of Ethnopharmacology* 56 (1997) 103–108.
- [80] E. Finkelstein, G.M. Rosen, E. J. Rauckman. Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxide spin-trapped adducts. *Molecular Pharmacology* 21 (1982) 262–265.
- [81] Camiel De Ranter, Tomasz A. Olszak, Oswald M. Peeters, Norbert M. Bleton. *Acta Crystallographica, Section C*. 50(1994)1930–1931.
- [82] N. Sampath, S. M. Malathy Sony, M. N. Ponnuswamy, M. Nethaji. *Acta Crystallographica, Section C*. 59 (2003) 346–348.
- [83] C. Rigol, C. Olea-Azar, F. Mendizábal, R. Briones, H. Cerecetto and M. González. Theoretical Study on 5-Nitrofuryl Thiosemicarbazone Radicals Electronic Properties. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, In Press, Accepted Manuscript, Available online 6 June 2006.
- [84] F.H. Allen and O. Kennard. 3D Search and Research Using the Cambridge Structural Database. *Chemical Design Automation News* 8 (1993) 31–37.

Theoretical study on 5-nitrofuryl thiosemicarbazone radicals electronic properties

C. Rigol^{a,*}, C. Olea-Azar^{a,*}, F. Mendizábal^b, R. Briones^b, H. Cerecetto^c, M. González^c

^a Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Casilla, Santiago, Chile

^b Departamento de Química, Facultad de Ciencias Universidad de Chile, Casilla, Santiago, Chile

^c Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química y Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Received 2 May 2006; received in revised form 20 May 2006; accepted 24 May 2006

Available online 6 June 2006

Abstract

Theoretical studies of molecular conformations and electronic properties calculations of eight 5-nitrofuryl thiosemicarbazone free radicals, by means of ab initio (R/UHF), and DFT (R/UB3LYP) methods are presented and discussed in comparison with ESR and electrochemical experimental data. DFT calculated hyperfine coupling constants were used for the simulation of experimental spectra. We observed the molecules adopt mainly two conformations, both showing a pattern of spin density delocalization unusual for free radicals formed from aromatic nitrocompounds. Energy potential surfaces scanning through a determined dihedral angle were drawn to evaluate whether these conformations could coexist in equilibrium. Fukui and molecular orbital analysis were compared with ESR data as reactivity local indexes.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Nitrofurane; Electronic properties; Fukui

1. Introduction

5-Nitrofuranes have found popular use in the treatment of parasitic infections because of their antiprotozoal–antibacterial activity [1]. In Latin America parasitic diseases represent a major health problem. In particular Chagas' disease (American Trypanosomiasis), caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects approximately 20 million people from Southern California to Argentina and Chile [2–3].

The current chemotherapy against this parasite is still inadequate due to its undesired side effects [4]. Previous investigations suggest that the mode of action of several drugs against *T. cruzi* involves the generation of radical species through a reductive pathway, which can cause cellular damage directly by reacting with various biological macromolecules, or indirectly by generation of the highly reactive oxygen species like the hydroxyl radical, which is generated via iron mediated Haber–Weiss and Fenton reactions [5,6]. Other modes of action could involve the interaction of the

drugs with certain proteins acting as cysteine-protease inhibitors [7] or trypanothione reductase inhibitors [8,9].

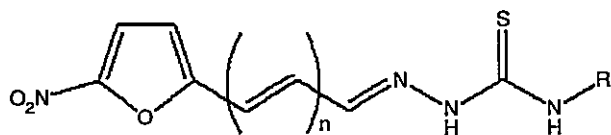
For these reasons it is important to study the different conformations that potential antiparasitic drugs can adopt, and to determine how these conformations and their ability to generate free radical species are related, in order to get an idea on which conformations could promise higher biological activities.

Studies of nitrofurane families have been performed where the structural differences caused the variation of some electronic properties like the reduction potential or the hyperfine coupling constants [10]. On the other hand we have previously reported electrochemical and ESR studies on antiprotozoal 5-nitrofurfural and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde derivatives. These have been shown to generate nitro anion radicals, which were characterized using ESR spectroscopy [11]. These techniques are now widely accepted and well developed as powerful tools in the identification of paramagnetic intermediates and other reaction products [12,13]. Likewise density functional methods are known as capable of providing reasonable predictions for ESR properties, the best results being obtained with the hybrid method B3LYP [14].

A theoretical study of molecular conformations of eight 5-nitrofuryl thiosemicarbazones, by means of a DFT (B3LYP) method is presented and discussed in comparison with ESR data (Fig. 1). A study of this kind was presented elsewhere [15]

* Corresponding authors.

E-mail address: crigol@entelchile.net (C. Rigol).



| | n | R |
|------|---|--------|
| NS1: | 0 | Ethyl |
| NS2: | 1 | Ethyl |
| NS3: | 0 | Phenyl |
| NS4: | 1 | Phenyl |
| NS5: | 0 | Methyl |
| NS6: | 1 | Methyl |
| NS7: | 0 | H |
| NS8: | 1 | H |

Fig. 1. 5-Nitrofuryl thiosemicarbazones.

with semiempirical geometry optimizations. In order to maintain a consistency in the calculations, as hyperfine coupling constants were calculated using B3LYP, the same study is presented here with optimizations at a B3LYP/6-31G* level.

The objective of the present work is to study theoretically the electronic properties of a family of 5-nitrofuryl thiosemicarbazone radicals at a B3LYP level. The resulting data is compared with experimental electrochemical and ESR data presented by Rigol et al. (2005).

2. Theory, models and methods

Considering the importance of the evaluation of the ability of these drugs to accept electrons, we also explored a possible relationship between the electron affinity (EA) and the electrophilicity index, and the reduction potential obtained experimentally as the cathodic peak potential (E_{cp}). This latest (ω) is an important reactivity descriptor that measures the energy stabilization upon electronic saturation of the system when electrons flow from the surroundings with a higher chemical potential than that of the system [16]. The EA and the electrophilicity index were calculated using the equation given by Koopman's theorem [17]

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} = \frac{(IP + EA)^2}{4(IP - EA)} \cong \frac{(-\varepsilon_{HOMO} - \varepsilon_{LUMO})^2}{4(-\varepsilon_{HOMO} + \varepsilon_{LUMO})}$$

where μ and η are the chemical potential and hardness, respectively, IP and EA are the ionization potential and the electron affinity of a molecular system, and ε_{HOMO} and ε_{LUMO} are the energies of the highest occupied molecular orbital (HOMO) and lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), respectively. From Koopmans theorem, the electron affinity (EA) and the ionization potential (IP) are related to HOMO and LUMO energies according to $IP = -\varepsilon_{HOMO}$ and $EA = -\varepsilon_{LUMO}$.

These theoretical electronic properties (EA and ω) are both interpreted in this study as global indexes of the ability to generate radical anion species, and correlated with the experimental reduction potentials presented previously [15].

Condensed Fukui nucleophilic attack functions were calculated to determine the local reactivity of the molecule when it encounters an electron. The Fukui functions were defined by Parr and Yang according to Eqs. (1) and (2) [18,19]

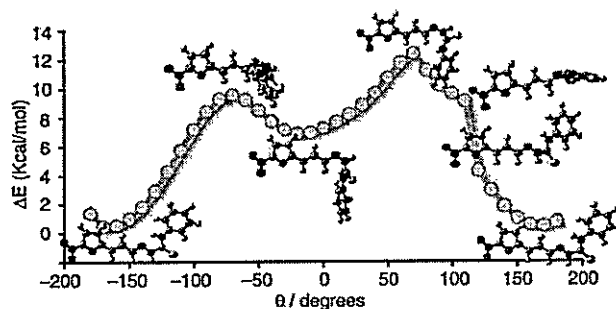


Fig. 2. Energy surface of compound NS4.

$$f^-(r) = \rho_N(r) - \rho_{N-1}(r) \quad (1)$$

$$f^+(r) = \rho_{N+1}(r) - \rho_N(r) \quad (2)$$

where ρ is the electronic density. Condensing under Yang and Mortier atoms in molecules resolution (AIM) we obtain (3) and (4) [20]

$$f_k^- = q_k^{N-1} - q_k^N \quad (3)$$

for the electrophilic attack, and

$$f_k^+ = q_k^N - q_k^{N+1} \quad (4)$$

for the nucleophilic attack, where q_k is the Mulliken atomic charge over the atom k .

The density functional theory implemented in the GAUSSIAN 98 [21] computational package was used to optimize the geometry of the eight nitrofuryl derivatives. All the optimizations have been performed using Becke's three parameter exact exchange functional (B3) [22] combined with gradient corrected correlation functional of Lee-Yang-Parr (LYP) [23] of DFT method (U)B3LYP/6-31G* and calculations of electronic properties at (U)B3LYP/6-31G* and HF/3-21G [24,25] levels. HF/3-21G was used when B3LYP/6-31G* displayed negative LUMO energies. Otherwise a consistency in the methodology was maintained using B3LYP/6-31G* in all calculations. The calculation of hyperfine coupling constants and Mulliken atomic charges were performed in the same DFT method as the geometry optimizations in order to maintain a consistency in the results.

These results were compared with lumo orbital analysis and ESR coupling constants as local reactivity descriptors.

Table 1

Correlations between the electronic affinity (as the difference of energies and as the $-\varepsilon_{LUMO}$) and the electrophilicity (ω) versus the experimental reduction potentials (E_{cp})

| Compound | E_{pc} (V) | $E_{NE} - E_{RA}$ (eV) | $-\varepsilon_{LUMO}$ (eV) | ω (eV) |
|----------|--------------|------------------------|----------------------------|---------------|
| NS1 | -0.79 | 1.69 | -0.09 | 1.01 |
| NS2 | -0.79 | 1.54 | -0.53 | 0.85 |
| NS3 | -0.78 | 1.74 | -0.31 | 0.94 |
| NS4 | -0.77 | 1.85 | -0.15 | 1.00 |
| NS5 | -0.79 | 1.60 | -0.17 | 1.01 |
| NS6 | -0.79 | 1.42 | -0.62 | 0.83 |
| NS7 | -0.84 | 1.31 | -0.73 | 0.84 |
| NS8 | -0.84 | 1.58 | -0.73 | 0.28 |

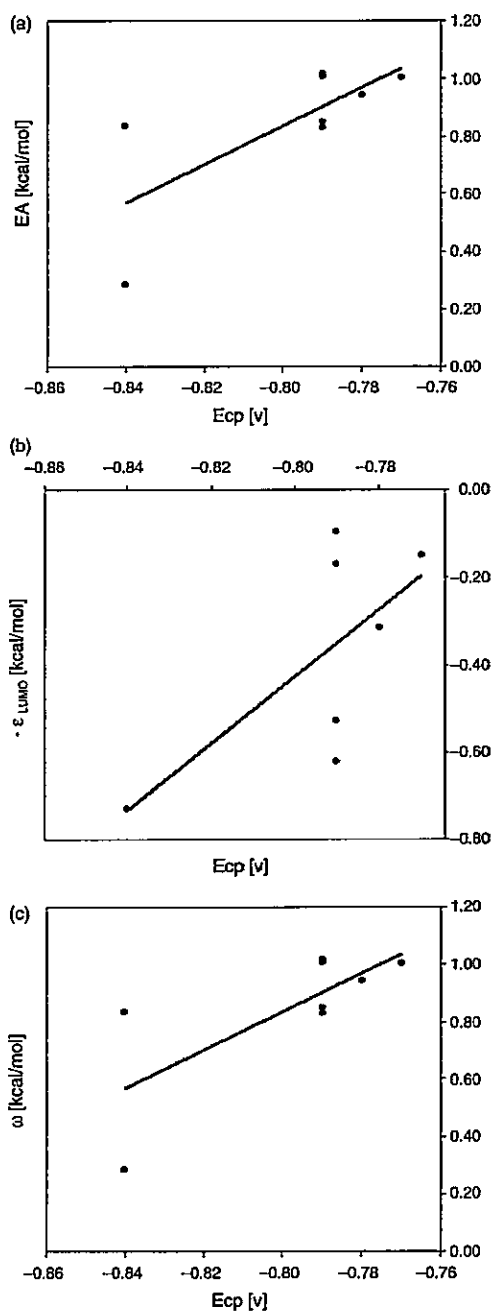


Fig. 3. Plots of the correlations between the electronic affinity (as the difference of energies) and as the $-\epsilon_{LUMO}$ and the electrophilicity (ω) versus the experimental reduction potentials (E_{cp}).

3. Results and discussion

Two different conformations were obtained from the DFT geometry optimizations in the nitrofuryl family whether the molecules have got a short ($n=0$) or a long ($n=1$) side chain according to the similarities between the theoretical ESR spectra obtained from the DFT hyperfine coupling constants and the experimental spectra. The $n=0$ molecules adopt a folded conformation stabilised by the presence of a hydrogen

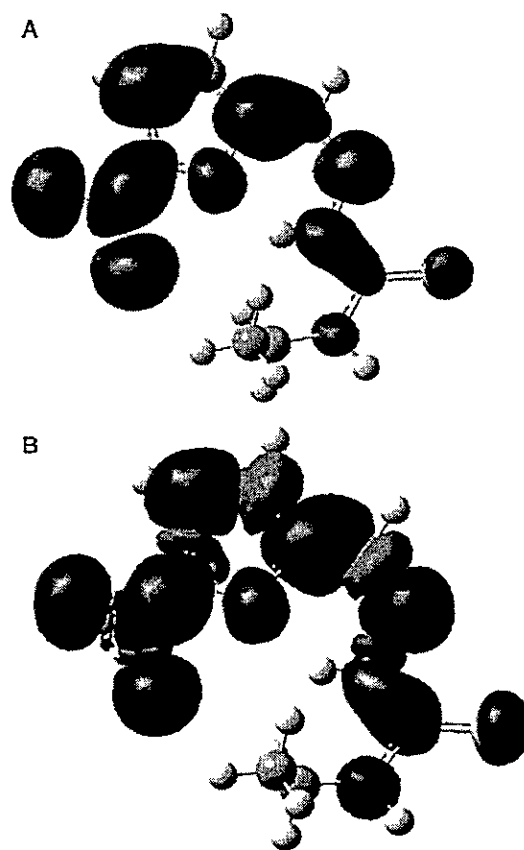


Fig. 4. LUMO orbital (A) and spin density (B) surfaces on compound NS1.

bond, while the $n=1$ molecules expand their side chain searching for a stabilisation through planarity.

In order to find out whether these two conformations coexisted in equilibrium we performed an energy scan along a dihedral angle in the molecule. The dihedral angle (NNCN)

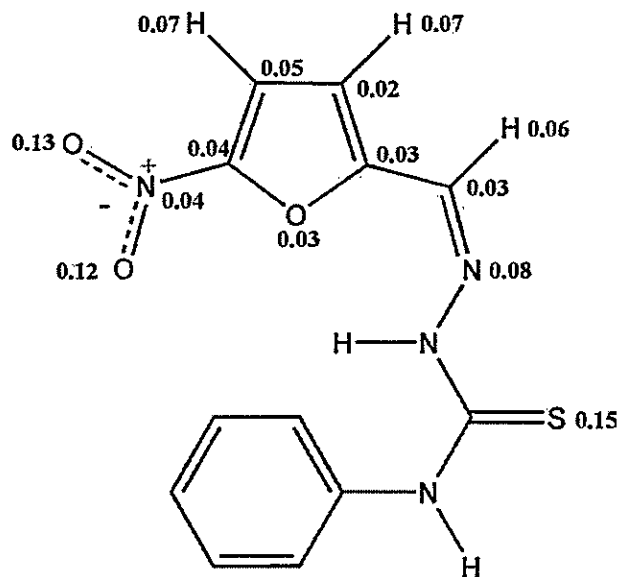
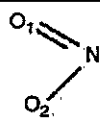


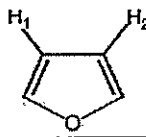



Fig. 5. Nucleophilic Fukui functions of the most reactive atoms on compound NS3.

Table 2
 f_k^+ Values of most relevant nuclei of eight 5-nitrofuryl thiosemicarbazone derivatives

| | |  | | |  | |  |  | |  |
|---------|-----|---|-----|------|---|------|---|--|------|---|
| | | n | R | O1 | O2 | N | S | H1 | H2 | H |
| f_k^+ | NS1 | 0 | Et | 0.13 | 0.14 | 0.08 | 0.14 | 0.07 | 0.07 | 0.06 |
| | NS2 | 1 | Et | 0.11 | 0.10 | 0.06 | 0.11 | 0.06 | 0.06 | 0.05 |
| | NS3 | 0 | Ph | 0.13 | 0.12 | 0.08 | 0.15 | 0.07 | 0.07 | 0.06 |
| | NS4 | 1 | Ph | 0.10 | 0.10 | 0.06 | 0.15 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| | NS5 | 0 | Met | 0.13 | 0.14 | 0.08 | 0.14 | 0.07 | 0.07 | 0.06 |
| | NS6 | 1 | Met | 0.10 | 0.10 | 0.05 | 0.10 | 0.05 | 0.02 | 0.07 |
| | NS7 | 0 | H | 0.12 | 0.13 | 0.07 | 0.13 | 0.07 | 0.07 | 0.07 |
| | NS8 | 1 | H | 0.11 | 0.10 | 0.06 | 0.12 | 0.06 | 0.06 | 0.06 |

was chosen for its possibility of changing the conformation of the molecules from folded to extended (Fig. 2). We found in that for these two conformations to coexist, they must overpass an energy barrier of 10 kcal/mol approximately, which corresponds to the breakage of the hydrogen bond.

These results showed none significant differences with the semiempirical optimizations presented by Rigol et al. [15]. It is needless to say that the optimizations were extremely more demanding regarding computational characteristics and time when performed at DFT level, providing not much more accurate results, as mentioned.

However, regarding the rationalization of the electrochemical experimental data, semiempirical optimizations delivered poor correlations with theoretical data (correlation coefficients (r) between 0.30 and 0.40).

The same study was repeated using the DFT optimized geometries. Table 1 shows the experimental cathodic reduction potential, the Electron Affinity (EA), the negative of the LUMO energy, and the electrophilicity index (ω) of the eight nitrofuryl derivatives studied.

Fig. 3 shows the correlations between the Electronic Affinity (as the difference of energies and as the $-\varepsilon_{\text{LUMO}}$) and the electrophilicity (ω) versus the experimental reduction potentials (E_{cp}) which resulted 0.67, 0.76 y de 0.73, respectively. We observe an improvement in these results compared to those obtained semiempirically (0.39, 0.36 y 0.40, respectively, data not shown).

Fig. 4 shows how the LUMO orbital and the spin density are distributed along molecule NS1 ($n=0$, R=ethyl). We observe a good agreement between both surfaces finding a localization of the radical spin density in the nuclei where the lowest energy orbital is spread, i.e. the nitro group, the furanic protons and the semicarbazonic nitrogen atom. The condensed Fukui functions calculated from the Mulliken charges were compared with the spin density localization in order to determine the reactive zones of the molecules. As shown in Fig. 5 the reactivity is displayed as the nucleophilic Fukui function f_k^+ , being the oxygen atoms of the nitro moiety, the sulfur and one of the semicarbazonic nitrogen atoms the most reactive centers

when facing the attack of an electron. These values agree with surface shown in Fig. 4, which shows a localization of the spin density in those same regions. As we see in Table 2, electrophilic Fukui functions in the most relevant nuclei, i.e. those with better reactivity, show a dependence with the length of the molecule's side chain ($n=0, 1$). As we know this is strictly related to the two different conformations, folded and extended, these compounds can adopt. Folded conformations increase the local reactivity (when comes to accepting an electron) of the nitro group, as well as extended conformations favor the electrophilic local reactivity of the semicarbazone nitrogen atom (N–N). The substituent moieties are not relevant regarding local reactivities. We must keep in mind that the Fukui functions were calculated from the closed shell structures, this means f_k^+ represents the system's ability to accept an electron, or better said, it shows where it's staying once accepted. With these results we can say the Fukui function worked as a very good projector of electron localisation. This also agreed with the experimental ESR data of these molecules [15]. From these results we can state that the methodology chosen for this sort of calculations displays accurate and consistent results.

4. Conclusions

The two conformations analysed are able to coexist in equilibrium, once a barrier corresponding to a hydrogen bond is passed. On the other hand, this theoretical study, in which the geometry optimizations and the determinations of the electronic properties were performed using DFT based calculation methodologies, showed a good agreement between experimental and theoretical properties. The good correlation between theoretical electronic properties and experimental reduction potentials showed, in addition to the theoretical–experimental agreement, that the studied reductions, those of the nitro moiety, are probably purely electrochemical type reactions, with no chemical reactions involved.

Acknowledgements

This research was supported by FONDECYT 1030949 grant, CONICYT AT-4040020 grant, U. de Chile DID graduate grant PG-65.

References

- [1] R. Docampo, N.J. Moreno, *Rev. Infect. Dis.* 6 (1984) 223.
- [2] C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizabal, A. Morello, J.D. Maya, C. Moncada, E. Cabrera, R. Di Maio, M. Gonzalez, H. Cerecetto, *Free Radic. Res.* 37 (9) (2003) 993.
- [3] Carolina Rigol, C. Olea-Azar, Fernando Mendizabal, Lucía Otero, Dinorah Gambino, Mercedes González, Hugo Cerecetto, *Spectrochimica Acta Part A* 61 (2005) 2933.
- [4] Gabriela Aguirre, Lucía Boiani, Hugo Cerecetto, Marcelo Fernández, Mercedes González, Ana Denicola, Lucía Otero, Dinorah Gambino, Carolina Rigol, Claudio Olea-Azar, Mario Faundez, *Bioorg. Med. Chem.* 12 (2004) 4885.
- [5] Salvatore Cuzzocrea, Dennis P. Riley, Achille P. Caputi, Daniela Salvemini, *Pharm. Rev.* 53 (2001) 135.
- [6] W.H. Koppenol, *Free Rad. Biol. Med.* 15 (1993) 645.
- [7] Juan C. Engel, Patricia S. Doyle, James Palmer, Ivy Hsieh, Dorothy F. Bainton, James H. McKerrow, *J. Cell Sci.* 111 (1998) 597.
- [8] C. Chan, H. Yin, J. Garforth, J.H. McKie, R. Jaouhari, P. Speers, K.T. Douglas, P.J. Rock, V. Yardley, S.L. Croft, A.H. Fairlamb, *J. Med. Chem.* 41 (1998) 148.
- [9] Juan Diego Maya, Soledad Bollo, Luis J. Nuñez-Vergara, Juan A. Squella, Yolanda Repetto, Antonio Morello, Jacques Périé, Gérard Chauvière, *Biochem. Pharmacol.* 65 (2003) 999.
- [10] C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizabal, A. Morello, J.D. Maya, C. Moncada, E. Cabrera, R. Di Maio, M. Gonzalez, H. Cerecetto, *Free Radic. Res.* 37 (2003) 993.
- [11] C. Olea-Azar, Ana Maria Atria, Fernando Mendizabal, Rossanna di Maio, G. Seoane, Hugo Cerecetto, *Spectrosc. Lett.* 31 (1998) 99.
- [12] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, second ed., Wiley—VCH, New York, 2000, P. 28.
- [13] *Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals*, Prof. Dr. Fabian Gerson, P.D. Dr. Walter Huber. Copyright © 2003 Wiley—VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [14] *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, second ed., Chapter 11, Wolfram Koch, Max C. Holthausen, 2001 Wiley-VCH.
- [15] Carolina Rigol, C. Olea-Azar, Fernando Mendizabal, Lucía Otero, Dinorah Gambino, Mercedes González, Hugo Cerecetto, *Spectrochimica Acta Part A* 61 (2005) 2933.
- [16] J. Cadet, A. Grand, C. Morell, J.R. Letelier, J.L. Moncada, A.J. Toro-Labbé, *Phys. Chem. A* 107 (2003) 5334.
- [17] T.A. Koopmans, *Physica I* (1933) 104.
- [18] R.G. Parr, W.J. Yang, *Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 4049.
- [19] W. Yang, *Density Functional Theory of Atoms and Molecules*, Oxford University Press, New York, 1989.
- [20] W. Yang, W.J. Mortier, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 5708.
- [21] M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, V.G. Zakrzewski, J.A. Montgomery Jr., R.E. Stratmann, J.C. Burant, S. Dapprich, J.M. Millam, A.D. Daniels, K.N. Kudin, M.C. Strain, O. Farkas, J. Tomasi, V. Barone, M. Cossi, R. Cammi, B. Mennucci, C. Pomelli, C. Adamo, S. Clifford, J. Ochterski, G.A. Petersson, P.Y. Ayala, Q. Cui, K. Morokuma, N. Rega, P. Salvador, J.J. Dannenberg, D.K. Malick, A.D. Rabuck, K. Raghavachari, J.B. Foresman, J. Cioslowski, J.V. Ortiz, A.G. Baboul, B.B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. Gomperts, R.L. Martin, D.J. Fox, T. Keith, M.A. Al-Laham, C.Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P.M.W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M.W. Wong, J.L. Andres, C. Gonzalez, M. Head-Gordon, E.S. Replogle, J.A. Pople, *GAUSSIAN 98*, Revision A.11.2, Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA, 2001.
- [22] A.D. Becke, *Phys. Rev. A* 38 (1998) 3098.
- [23] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
- [24] Michael J.S. Dewar, Eve G. Zebisch, Eamonn F. Healy, James J.P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3902.
- [25] C.C.J. Roothaan, *Rev. Mod. Phys.* 23 (1951) 69.

Applications of Electron Spin Resonance and Spin Trapping in Tropical Parasitic Diseases

C. Olea-Azar^{*1}, C. Rigol¹, F. Mendizábal² and R. Briones¹.

¹ Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias Universidad de Chile

Abstract: Free radicals may be reaction intermediates in biological systems in more situations than are presently recognized. However, progress in detecting such species by Electron Spin Resonance (ESR) has been relatively slow. ESR is a very sensitive technique for free radical detection and characterization. It can be used to investigate very low concentrations of radicals provided that they are stable enough for their presence to be detected. For unstable radicals special techniques have to be employed. One of these methods is called Spin Trapping.

Parasitic diseases in tropical and subtropical areas constitute a major health and economic problem. The range of antiparasitic drugs varies widely in structural complexity and action at the subcellular and molecular levels. However, a number of these drugs are thought to exert their action by generating free radicals. Most of the free radical producing drugs used against parasites are: quinones, naphthoquinones, quinone-imines, aminoquinolines, *N*-oxides and nitroheterocyclic compounds.

This review summarizes some of the more relevant achievements of ESR and Spin Trapping applications in parasitic diseases studies. The use of ESR spectroscopy to obtain relevant information about free radical characterization and the analysis of the mechanisms of action of drugs involved in several parasitic diseases is also presented.

Keywords: ESR; Spin Trapping; Free Radical; Parasitic diseases.

1. INTRODUCTION

Parasitic diseases in tropical and subtropical areas constitute an economic problem. Considering the progress of mankind at the end of the twentieth century, parasitic diseases are synonymous with ignorance and low level of education and income. For example Chagas' disease is endemic in Latin America, affecting 16-18 million people, with more than 100 million exposed to the risk of infection (WHO 1997) [1].

The last three decades research into free radicals has led to a better understanding of physiological and drug induced production of free radicals in biological systems, including the parasites'. The drugs used for treatment in parasitic diseases are known to act through several mechanisms. However the most studied drugs, and the ones with apparently better antiparasitic results are those which involve a free radical generation mechanism. The families studied as free radical producing drugs include quinones, quinone-imines, aminoquinolines and nitroheterocyclic compounds.

The progress in detecting such species by Electron Spin Resonance (ESR) has been relatively slow. ESR spectroscopy is a technique that allows the detection and quantification of paramagnetic species i.e. compounds with unpaired electrons. It can be used to investigate very low concentrations of radicals provided that they are stable

enough for their presence to be detected [2]. In biological systems the direct detection of free radicals is often not possible because of their high reactivity and transient nature. At this time, Spin Trapping is used as a technique to make this feasible [3,4].

This review summarizes some of the most relevant achievements of interest about ESR and Spin Trapping applications in the study of tropical parasitic diseases. We also present the use of ESR spectroscopy to obtain relevant information about the mechanism of action of drugs in some parasitic diseases.

2. ESR AND SPIN TRAPPING GENERAL PRINCIPLES

2.1 Electron Spin Resonance (ESR)

Paramagnetism arises as a consequence of the presence of unpaired electrons within an atom or a molecule. It can be said that Electron Spin Resonance (ESR), often called Electron Paramagnetic Resonance (EPR), is the most direct and sensitive technique to investigate paramagnetic materials.

ESR is similar to Nuclear Magnetic Resonance (NMR), the fundamental difference being that ESR is concerned with the magnetically induced splitting of electronic spin states, while NMR describes the splitting of nuclear spin states. In both ESR and NMR, the sample material is immersed in a strong static magnetic field and exposed to an orthogonal low-amplitude high-frequency field. ESR usually requires microwave-frequency radiation (GHz), while NMR is

*Address correspondence to this author at the Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile; Tel: +56-26782834; Fax: +56-2-7370567; E-mail: colea@uchile.cl

observed at lower radio frequencies (MHz). In ESR spectroscopy, energy is absorbed by the sample when the frequency of the radiation is coincident with the energy difference between two electronic states in the sample, but only if the transition satisfies the appropriate selection rules. Splitting can occur only when the electron is in a state with non-zero total angular momentum, i.e. electrons in atoms with closed atomic shells cannot show this behavior [2].

For a free electron the spin angular momentum can have two possible orientations and these give rise to two spin states of opposite polarity. In the absence of an external magnetic field the two spin states are degenerate. However, if an external magnetic field is applied the degeneracy is lifted, resulting in two states of different energy. This splitting is called the Zeeman effect. A peak in the absorption will occur when the magnetic field "tunes" the two spin states so that their energy difference matches the energy of the radiation.

Knowledge of the *g* values and the detailed hyperfine interactions (*a* values) allow to identify radical species, and these parameters contain information about the electron distribution within the molecule. Radicals are often present as intermediates during a reaction; consequently their identification will give information concerning the reaction mechanism and measurement of how their concentration changes with time will give kinetic data.

2.2 Spin Trapping

ESR spin trapping techniques have successfully been applied to determine and identify free radical intermediates in biology. Spin trapping allows one to determine if short-lived free radicals are involved as reaction intermediates by scavenging the reactive radical to produce more stable radicals, detectable by ESR.

The technique of spin trapping was developed in the late 1960s to facilitate the detection of reactive free radicals by ESR spectroscopy [5-8]. This method involves the addition of the spin trap, typically an organic nitron or nitroso compound (Fig. 1), to the radical generating system in a concentration sufficient to ensure rapid reaction with any radicals present to give stable, detectable, nitroxide radical adducts. Nitroso spin traps, of which 2-methyl-2-nitrosopropane (MNP) and 3,5-dibromo-4-nitrosobenzene sulfonic acid (DBNBS) (Fig. 2) are the most commonly employed, have the advantage that the reactive radical attaches directly to the nitroso nitrogen atom, and is therefore in close proximity to the unpaired electron which is located primarily on the nitroxide function. This usually results in the detection of additional distinctive hyperfine couplings from magnetic nuclei present in the added radical. The size and nature of these couplings make adduct identification easier and more definitive. A number of compilations of data for such adducts are available; see also the spin trap database at the NIEHS website¹. The relatively small amount of kinetic data available on the rates of trapping of radicals is also consistent with the rate of addition of radicals to nitroso traps being more rapid than

with nitrones [4,9]. These traps do, however, have the disadvantage that they form long-living readily detectable adducts with a more limited range of radicals (usually limited to carbon-centered species) than nitron traps. The nitroso compounds give an adduct in which the radical added is bonded directly to the nitroxide nitrogen, so that the hyperfine splittings in the ESR signal are more diagnostic of the original radical. However the adducts are less stable than nitrones' and may decay within minutes.

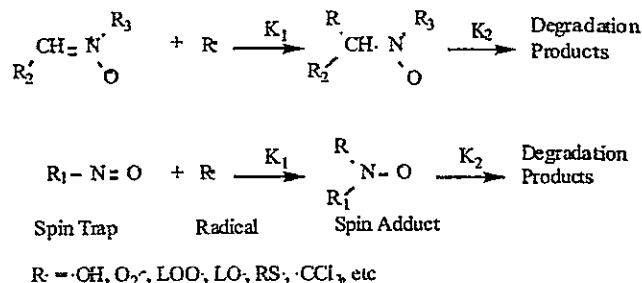


Fig. (1). Mechanism of the addition of free radical with of a spin trap typically an organic nitron or nitroso compounds.

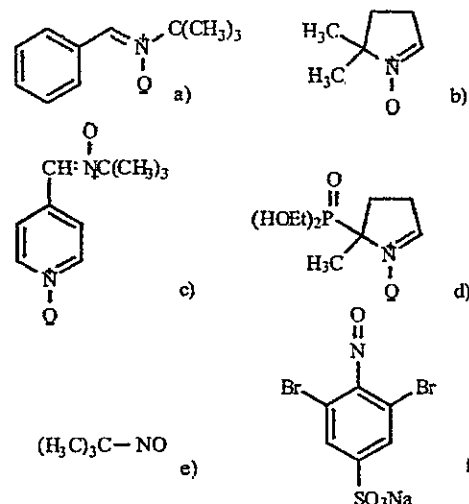


Fig. (2). Nitroso and nitron spin traps molecular structure, a) PBN; b) DMPO; c) POBN; d) DEMPO; e) MNP; f) DBNBS.

In contrast, nitron spin traps, including 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO), 5-diethoxyphosphoryl-5-methyl-1-pyrroline *N*-oxide (DEPMPO), *N*-tert-butyl- α -phenylnitron (PBN), and α -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-tert-butylnitron (POBN) (Fig. 2), often form long lived adducts with a wider range of radical species (e.g., carbon-, oxygen-, sulfur-, and nitrogen-centered species). However, with nitron spin traps the reactive radical adds to the carbon atom adjacent to the incipient nitroxide group, and is therefore more distant from the molecular orbital containing the unpaired electron. As a result it is often not possible to resolve any hyperfine couplings from the added radical itself. This makes the definitive assignment of the observed spectral lines to a particular species much more complicated. However, the magnitude of the hyperfine couplings arising from the spin trap-derived nitroxide nitrogen and especially the β -hydrogen, are dependent, particularly with the cyclic nitrones, on the nature and structure of the added radical as a result of the influence of this species on the conformation of

¹ (<http://EPR.niehs.nih.gov>)

the nitron. The size of these couplings can therefore provide valuable information on the nature of the radical trapped [10]. The use of spin traps to detect radicals in biological systems has been reviewed extensively [4,7].

3. BIOLOGICAL APPLICATIONS OF ESR AND SPIN TRAPPING TECHNIQUE

As introduced previously a number of antiparasitic agents have been shown to exert their actions through a free radical metabolism: nitro and *N*-oxide compounds used against trypanosomatids, anaerobic protozoa and helminths; the antimalarials primaquine, chloroquine, and quinghaosu; and quinones active *in vitro* and *in vivo* against different parasites [11].

Nifurtimox (Nfx) and benzimidazole ((5a,5b), (Fig. 3) are currently used to treat Chagas' disease. In general, the biological effects of nitroheterocyclic compounds, especially in *T. cruzi*, are believed to involve redox cycling of the compounds and oxygen radical production, two processes in which the nitroanion radicals play an essential role [12-15]. A characteristic ESR signal corresponding to the nitro radical appears when Nfx is added to intact *Trypanosoma cruzi* cells, the causative agent of Chagas' disease (American trypanomiasis) [16]. This and other experiments [17] suggest that intracellular reduction of Nfx followed by redox cycling yielding O_2^- and H_2O_2 , may be the major mode of action

against *T. cruzi*. However, the use of these drugs has disadvantageous side effects like fever, muscle weakness, abdominal or stomach pain, vomiting, etc [18], frequently forcing the treatment to be stopped. The mechanisms of these side-effects were not fully understood, particularly in the case of Nfx. Most studies available on the toxicology of Nfx correlate the occurrence of Nfx-induced deleterious effects with the nitroreductive biotransformation of this nitroheterocyclic compound. However, the hypothesis was advanced that peroxyxynitrite formation from Nfx resulting from the interaction of nitric oxide and superoxide generated during biotransformation of the Nfx might play a role in Nfx toxicity [19].

Derivatives (1) and (2) for instance (Fig. 3) showed interesting *in vitro* trypanocidal activity but failed to be good trypanocidal agents *in vivo* because of their inherent toxicity (mostly (2)) [13]. The undesirable toxicity of (1) and (2) on the host is probably due to the nitro moiety which acts as a nonselective redox-damaging function.

Olea-Azar *et al.* also reported a series of nitrocompounds that generated nitro anion radicals, which was proved by ESR spectroscopy [20,21]. Recently, Olea-Azar *et al.* [22] studied new analogues of Nfx ((3), (4) (Fig. 3). The free radical ESR spectra of these compounds is shown in (Fig. 4). Compound (4) showed better or at least similar biological activity against *T. cruzi* than Nfx, and it produced oxygen redox cycling in *T. cruzi* epimastigotes. The ESR

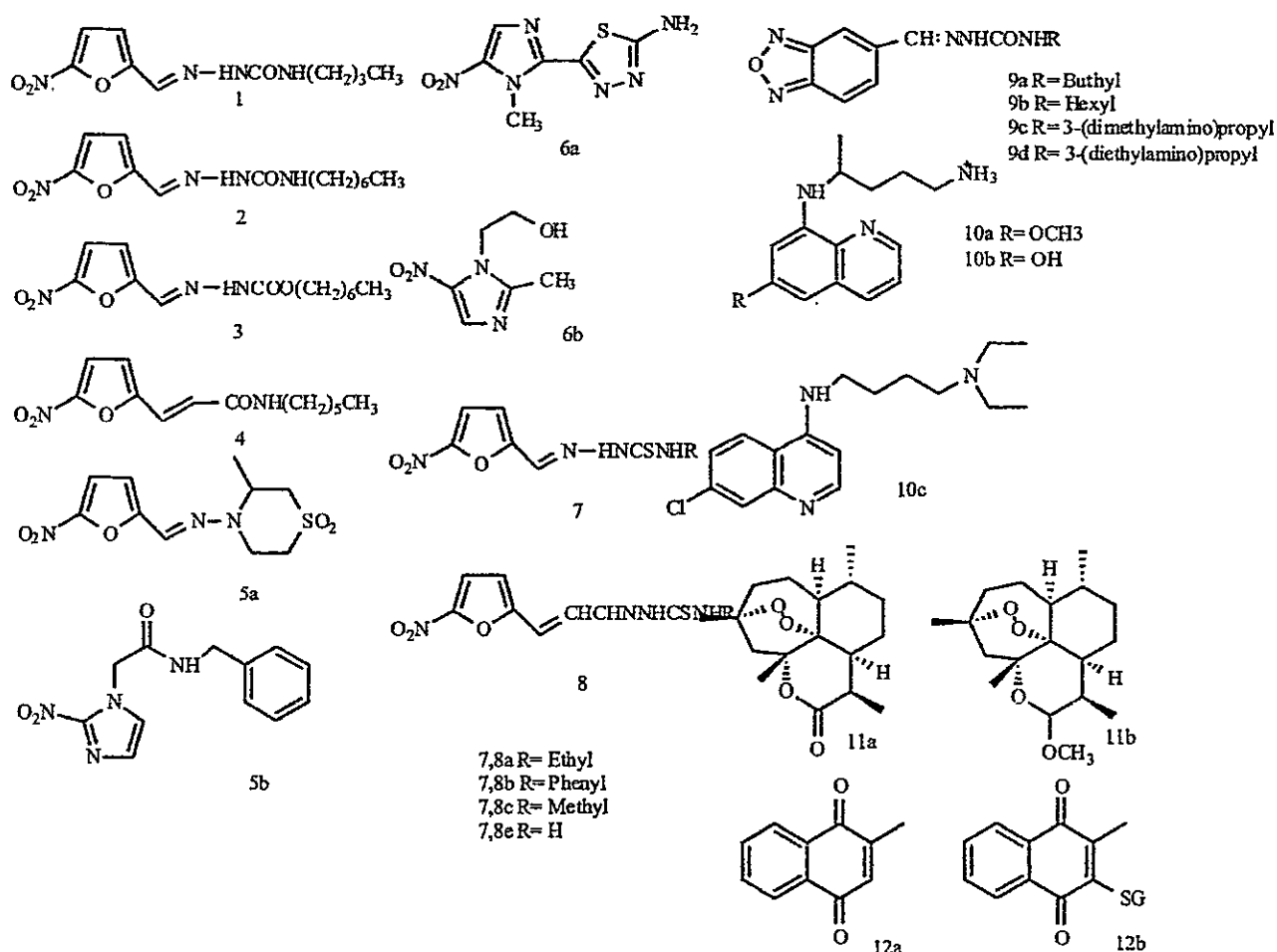


Fig. (3). Molecular structures of various antiparasitic compounds.

signal intensities were consistent with the trapping of both hydroxyl radical (\cdot) (Fig. 5) and the nitrofurane (\cdot) (Fig. 5) derivative radical by DMPO. These results were in agreement with the observation of increasing the oxygen uptake caused by the presence of the compound (4) in a *T. cruzi* incubation solution, meaning that the anti-Chagas activity of this compound was achieved by an oxidative stress mechanism.

Tsuhako *et al.* [23] studied the bioreductive activation of nitroimidazole derivative megalzol (compound (6a), (Fig. 3) promoted by ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase, rat liver microsome and cellular fractions of *T. cruzi*. Direct ESR detection and characterization by computer simulation of megalzol anion radical were possible in the presence of NADPH and ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase under anaerobic conditions. However, the megalzol anion radical was not detected in the presence of either rat liver microsomes or cellular fractions of *T. cruzi*. These results

indicate a restricted bioreductive metabolism of megalzol and suggested that the trypanocidal activity is unrelated to a redox cycling process.

Viode *et al.* reported that megalzol is a highly active compound used against several strains of *T. cruzi*. With the aim of determining the probable mode of action against the parasite, the interaction of megalzol with different redox enzymes was studied and compared with that of Nfx and metronidazole (compound (6b), (Fig. 3). The three nitroaromatic compounds are reduced by L-lactate cytochrome c-reductase, adrenodoxin reductase, and NADPH:cytochrome P-450 reductase, the efficiencies of the enzymatic reductions being roughly related to the reduction potentials of these pseudo-substrates. As the enzyme responsible for the reduction of megalzol within the parasite has not yet been identified, the nitroimidazole was assayed with *T. cruzi* lipoamide dehydrogenase and trypanothione reductase. Megalzol did not inhibit the physiological

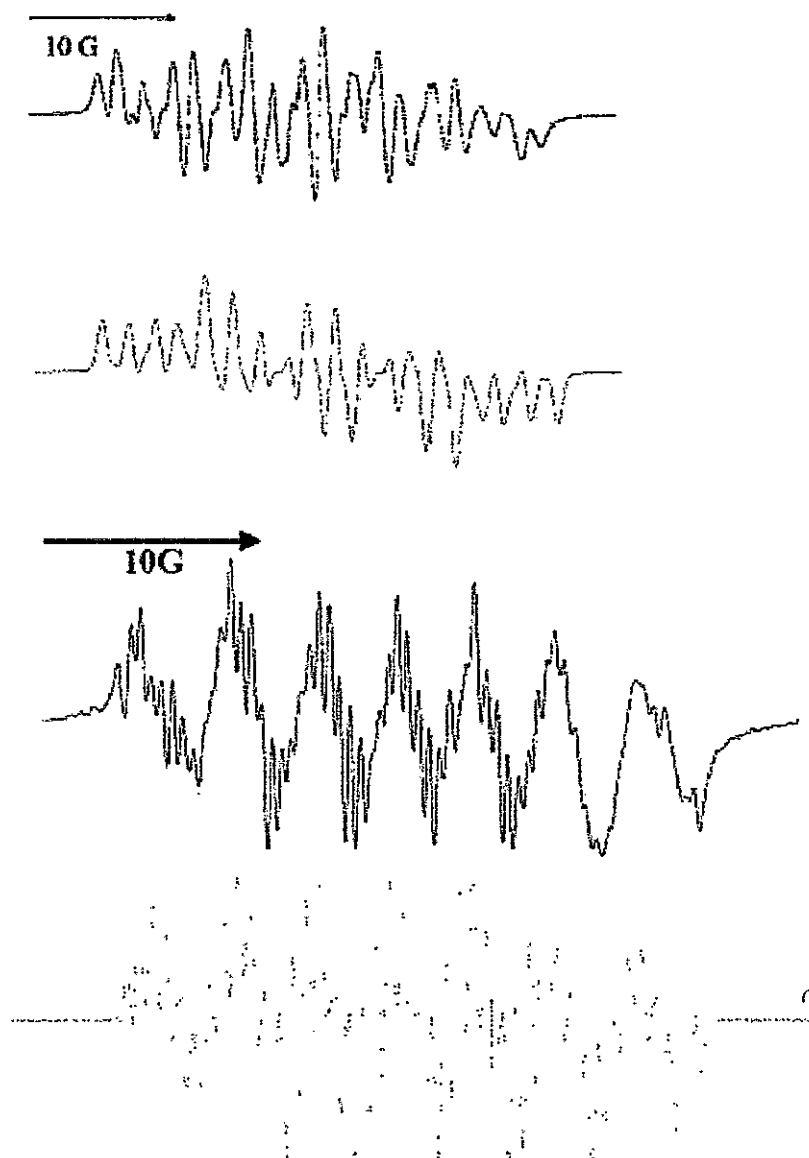


Fig. (4). (A) ESR experimental spectrum of the radical-anion of (3) (Fig. (4)) in DMSO and computer simulation of the same spectrum. (B) ESR experimental spectrum of the radical-anion of (4) in DMSO and computer simulation of the same spectrum.

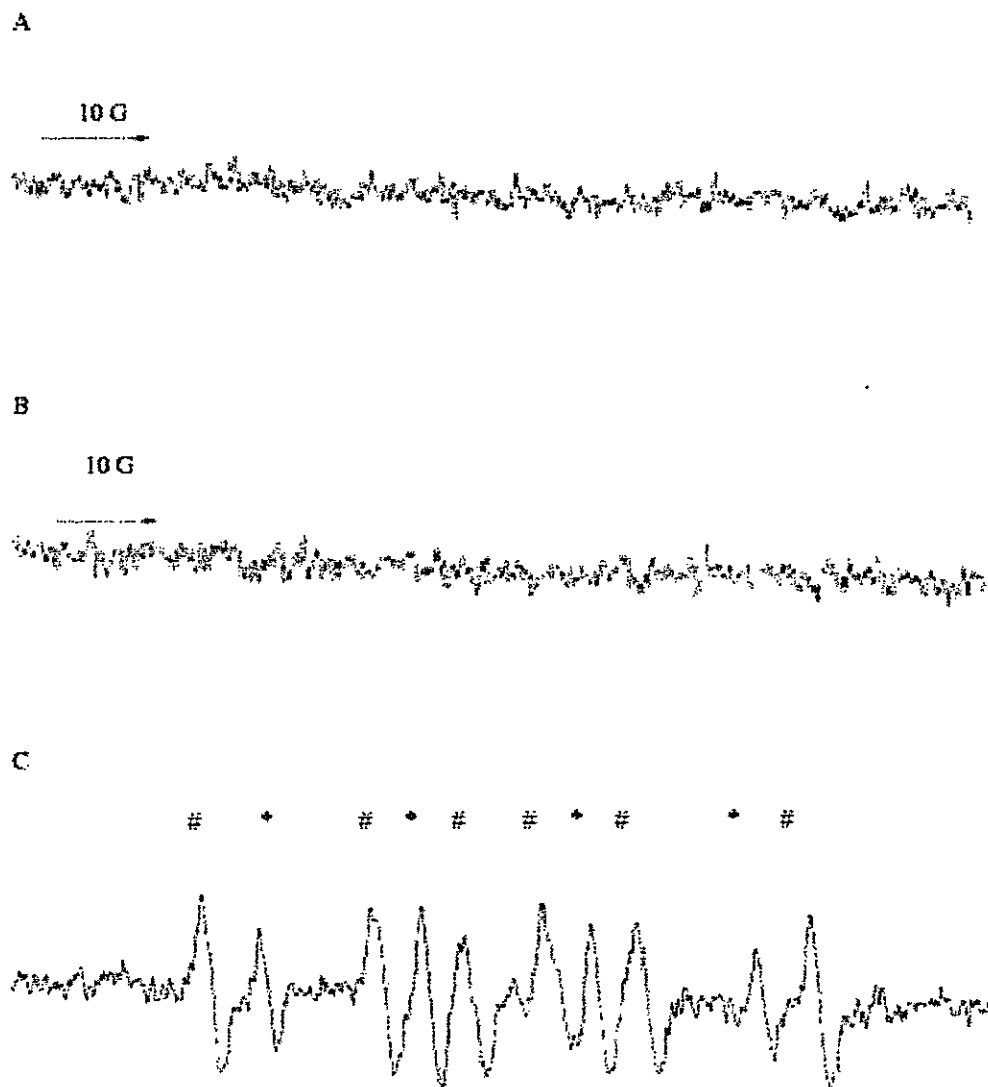


Fig. (5). ESR spectra of DMPO-OH· and DMPO-compound (4) (Fig. (4)) radical adducts obtained with *T. cruzi* extracts. The ESR spectra were observed 10 min after incubation at 37°C with *T. cruzi* microsomal fraction (4 mg protein/mL), NADPH (1mM), EDTA (1mM), in phosphate buffer (20mM), pH 7,4 and (A) acetonitrile (10 v/v) and DMPO (100mM), (B) Nitro 2 (1mM in acetonitrile 10 v/v) and (C) Nitro 2 (1mM in acetonitrile 10 v/v) and DMPO (100mM) (DMPO-OH adduct (*): $a_N = a_H = 14.78$ G; DMPO-Nitro 2 adduct (#): $a_N = 15.21$ G, $a_H = 23.48$ G. Spectrometer conditions: microwave frequency 9.68 GHz microwave power 20 mW, modulation amplitude 0.4G, scan rate 0.83 G/s, time constant 0.25 s number scans: 10.

reactions but proved to be a weak substrate of both flavoenzymes. The single electron reduction of this compound, as well as of Nfx and metronidazole, by NADPH:cytochrome P-450 reductase, by rat liver as well as by trypanosome microsomes was confirmed by ESR experiments. The interest relies in the fact that megazol interferes with the oxygen metabolism of the parasite as Nfx and metronidazole, but its extra activity when compared to Nfx may be related to other features not yet identified [24]. These results are in agreement with Tshako's in terms of the fact that it seems likely that because of its high biological activity against *T. cruzi*, megazol acts on more than one single target. This acquires particular interest taking into account the severe side effects of nitrocompounds and their carcinogenicity.

Aguirre *et al.*, [25] studied the *in vitro* activity and the mechanism of action against *T. cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones ((7), (8) (Fig. 3). Free radical production was detected when the compounds were incubated in presence of mammalian liver microsomes. All the 5-nitrofuryl thiosemicarbazone derivatives were capable to produce free radicals in biological medium. So, the microsomal incubations of all the compounds gave an ESR spectrum after a brief induction period of 1–2min. The authors analyzed theoretically the biological behaviour of the studied compounds. All derivatives showed similar values of atomic charge on NO₂ nitrogen. This fact confirmed the results obtained in the ESR experiments. The compounds possess similar electrochemical behaviour, so they could act biologically in an initial redox pathway.

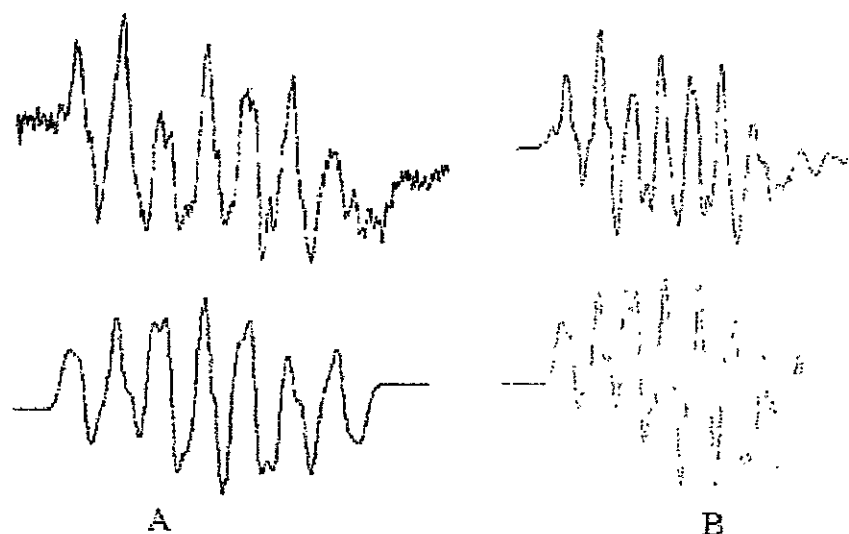


Fig. (6). A Up: ESR spectrum of (9a) (Fig. (4)) *N*-oxide derivate generated by microsomal system. Bottom: Computer simulation of the same spectrum

B Up: ESR spectrum of (9c) (Fig. (4)) *N*-oxide derivate generated by microsomal system. Bottom: Computer simulation of the same spectrum.

Like the nitro pharmacophore of antitrypanosomal drugs, the *N*-oxide moiety has proved to be responsible for the biological activity of different families of drugs (with antitumor or antibacterial activities) through the production of free radical species [26,27].

Cerecetto *et al.* reported studies on the 1,2,5-oxadiazole *N*-oxide family (compound (9), (Fig. 3) in order to determine their antitrypanosomal activities, tested *in vitro* against the epimastigote form of *T. cruzi* [28]. Moreover, they have shown ESR spectra that prove the facile electronation of the *N*-oxide moiety. Besides, these new structures were based on the conjunction of *N*-oxide systems and the semicarbazide moieties similar to Trypanothione, substrate of Trypanothione reductase involved in the defense mechanism of trypanosomatids, against oxidative stress. Olea-Azar *et al.* characterized the free radical species of *N*-oxide families generated by microsomal reduction, using ESR spectroscopy (Fig. 6) [29]. The hyperfine splitting pattern of these biochemically generated free radicals was the same as that obtained by electrochemical reduction. Also, the ESR spectra proved that the reduction mechanism of these compounds involves the protonation of the *N*-oxide group, as suggested by the cyclic voltammetric results.

As we can see, oxidative stress might play a key role in many fatal endpoints caused by other diseases and —at the same time— it represents a most promising rationale for e.g. antimalarial chemotherapy. The detoxification of reactive oxygen species (ROS) is a challenge for erythrocytes infected with *Plasmodia*. In this regard it is interesting to note that a number of drugs currently in clinical use exert their activities, at least in part, by increasing oxidative stress in the parasitized erythrocyte [30]. That is the case of primaquine ((10a) (Fig. 3), an 8-aminoquinoline, which is the only tissue schizonticide currently available for free radical treatment of malarial infections. Its utility is compromised by its toxic effects on erythrocytes, and indeed

primaquine was one of the first agents recognized to produce oxidative stress [31,32]. Despite its importance, years ago it was not clear whether the pharmacological effects of primaquine were due to the parent compound or to its metabolites. In 1988, Ohara *et al.* [33] detected, by ESR spectroscopy, during enzymatic oxidation of primaquine, a drug-derived radical. The results showed the generation of a radical species during to the oxidation of primaquine catalyzed by horseradish peroxidase-H₂O₂ or methemoglobin-H₂O₂. A complex product distribution is expected during aromatic amine oxidations, as the initial products are more easily oxidized than the parent compound, undergoing rearrangements and addition reactions. However, comparison of the obtained ESR parameters with those reported in the literature indicated that a benzidine-like rearrangement is the most plausible to happen. The further generation of a benzidine-like radical in the presence of nucleophilic groups can lead to further condensation reactions accounting for the polymeric nature of the reaction products. A similar spectrum was detected during enzymatic oxidation of 6-hydroxyprimaquine ((10b) (Fig. 3) at pH 9.0. Simulations of ESR spectra indicated that the free radicals contain two primaquine moieties and the authors stated that this *in vitro* oxidation of primaquine to a free radical intermediate stable in the presence of oxygen might be considered as a new mechanistic route for analyzing the pharmacological effects of primaquine.

Various mechanisms of action have been found for the different drugs used in antimalarial chemotherapy. For example, chloroquine ((10c) (Fig. 3) acts by preventing toxic haem (ferri/ferroprotoporphyrin IX, FP) detoxification and its activity can be enhanced by depletion of GSH. In this work the authors observed that the redox cycling of the metabolites of primaquine [34] (Fig. 8) exerts a substantial oxidative stress, also artemisinin ((11a), (Fig. 3) commonly known as quinghaosu is thought to react with haem moieties forming cytotoxic radicals [35].

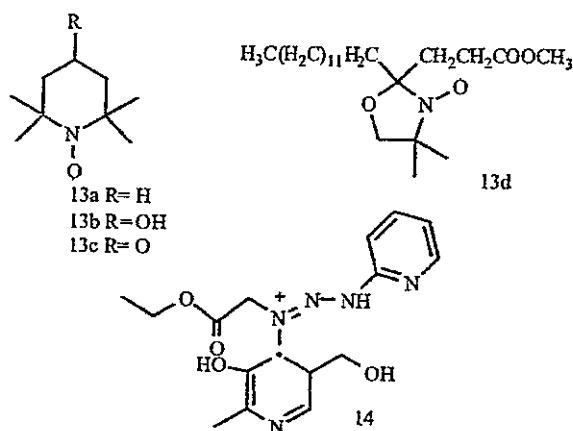


Fig. (7). Molecular structure of spin probes and iron chelator L2-9.

Deslauriers *et al.* [36] showed another mechanism of action concerning primaquine and studied it using ESR. Erythrocytes from normal mice and mice infected with the malarial parasite *Plasmodium berghei* reduce the water-soluble spin probes, stable paramagnetic compounds, usually nitroxides, 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO (13a), (Fig. 7), 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-4-hydroxy-*N*-oxyl (TEMPOL (13b), (Fig. 7), and 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-4-keto-*N*-oxyl (TEMPONE (13c), (Fig. 7) at similar rates under both air and N_2 atmospheres. The ESR signal of the lipid-soluble spin probe 5-doxylostearyl ((13d), (Fig. 7) is stable on incorporation into erythrocytes from normal mice. In contrast, parasitized red cells reduce this nitroxide probe, at a rate which increases with the level of parasitemia. Inhibitors of electron transport such as KCN and NaN_3 , increase the rate of reduction. It is proposed that nitroxide reduction occurs via the electron transport chain in the parasite. The antimalarial drug primaquine causes reduction of both water-soluble and lipid-soluble spin probes. This action of primaquine is independent of its ability to release H_2O_2 from oxyhemoglobin. The increased production of NADPH results in increased rates of reduction of the nitroxide radicals. Chloroquine, however has no such effect.

Parasitized mice treated with chloroquine six hours prior to ESR measurements show less nitroxide reducing capacity than do untreated mice. The metabolic influences of the two antimalarial drugs are, thus, quite different.

Malaria parasites have been shown to be more susceptible to oxidative stress than their host erythrocytes. A chloroquine resistant malaria parasite, *Plasmodium falciparum* (FCR-3) was found to be susceptible *in vitro* to a pyridoxal based iron chelator-(1-[*N*-ethoxycarbonylmethylpyridoxylidene]-2-[2'-pyridyl]hydrazone bromide (code named L2-9, (14) (Fig. 7). 2 h exposure to 20 μM L2-9 was sufficient to irreversibly inhibit parasite growth. Desferrioxamine blocked the drug effect, indicating the requirement for iron. Oxygen however, was not essential. Spectrophotometric analysis showed that under anoxic conditions, L2-9-Fe(II) chelate undergoes an intramolecular redox reaction which presumably involves a one electron transfer and is expected to result in the formation of free radicals. Spin trapping coupled to ESR studies of L2-9-iron chelate showed that L2-9-Fe(II) produced free radicals both in the presence and absence of cells, while L2-9-Fe(III) produced free radicals only in the presence of actively metabolising cells [30].

Another group of molecules, quinones, are naturally occurring pigments in a variety of plants and fungi, and some are clinically important antitumor drugs [37]. They are substrates for flavoenzymes and can undergo either one- or two- electron reduction, a property of importance in determining the cytotoxic and antitumor effects of quinones [38-40].

The bioactivation of exogenous compounds with quinone structures, like many chemotherapeutic agents, has been demonstrated to proceed via one-electron reduction to semiquinone radicals, which, in a redox-cycle with the quinones under aerobic conditions, may reduce molecular oxygen to superoxide anions. Redox-cycling of quinones and their semiquinones is thought to be responsible for the concomitant oxygen toxicity often observed. Van de Straat *et al.* investigated the possible role of cytochrome P-450 in the one-electron reduction of quinoid compounds as well as

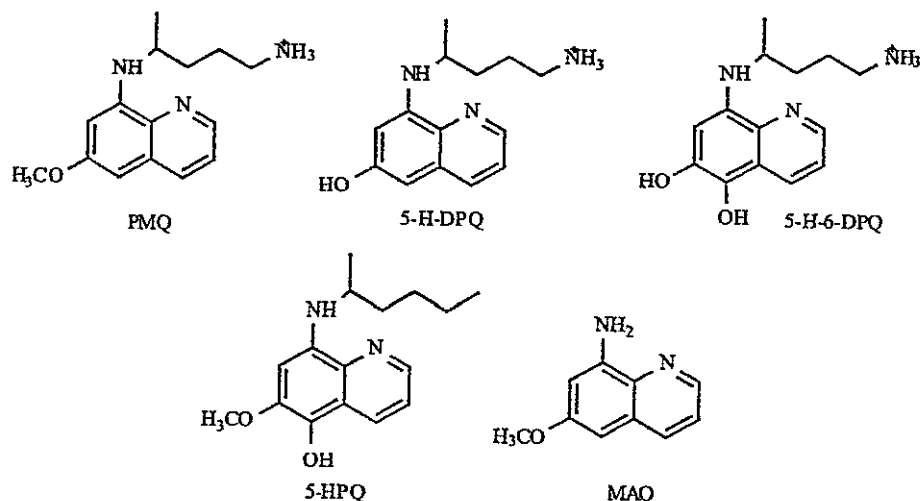


Fig. (8). Molecular structure of Primaquine metabolites with oxidative activity. PMQ = Primaquine; 5-HPQ = 5-hydroxyprimaquine; 5-H-DPQ = 5-hydroxydemethylprimaquine; 5-H-6-DPQ = 5,6-dihydroxydemethylprimaquine; MAQ = aminoquinoline.

in the formation of reduced oxygen species and used ESR combined with spin trapping to detect the free radicals formed [41]. Although menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone; vitamin K3 (**12a**) (Fig. 3) is used therapeutically, it is also cytotoxic and causes a marked decrease of intracellular thiols such as GSH and protein sulfhydryl groups and the formation of $O_2^{\cdot-}$ in large amounts. Takahashi *et al.* [42] reported the identification of the transient semiquinone-type radicals by ESR spectroscopy during the non-enzymatic reaction of both menadione ((**12a**) (Fig. 3) and 1,4-naphthoquinone with the biological reducing agents GSH and NADPH. The menadione-induced loss of cellular thiols occurs by their reaction with these active oxygen species and by the direct arylation of protein sulfhydryl groups and GSH. Reaction with GSH forms a menadione-GSH conjugate (2-methyl-3-S-glutathionyl-1,4-naphthoquinone; thiodione ((**12b**) (Fig. 3) at the 3-position [43]. The authors observed ESR spectra obtained by reaction of both naphthoquinones and their GSH conjugates in boric acid-borax buffer, pH 8.5, under a nitrogen atmosphere, generated by the reaction of Menadione semiquinone with different concentrations of GSH and of thiodione with NADPH. The spectra proved to be identical. This experiment led the authors to discuss that the incubation of menadione or 1,4-naphthoquinone with the reducing agent, NADPH, led to the formation of the corresponding semiquinone-free radical in buffer at pH 7.4, 8.5, or 9.0 under a nitrogen atmosphere. In the presence of GSH as a reducing agent, menadione and 1,4-naphthoquinone underwent conjugation with GSH at either or both of the 2- and 3-positions, depending upon the ratio of the quinone to GSH and net one-electron reduction to form the corresponding semiquinones. At lower GSH concentrations only reduction to the respective semiquinones was detected, as was reported for 1,4-naphthoquinone [44].

Artemisinin ((**11a**) (Fig. 3) and its derivatives represent a very important new class of antimalarials; they are becoming more and more commonly used throughout the world. Artemisinin structure is unlike those of any other known antimalarial and is thus likely to have a different mechanism of action. The first clue to its mechanism came from synthetic chemists who demonstrated that the endoperoxide bridge was necessary for antimalarial activity [45,46]. Since peroxides are a known source of reactive oxygen species such as hydroxyl radicals and superoxide [47], this observation suggested that free radicals might be involved in the mechanism of action. The role of free radicals in the biological mechanism of action of artemisinin derivatives was demonstrated in the late 1980s [48].

The mechanism of action of these compounds appears to involve the heme-mediated decomposition of the endoperoxide bridge to produce carbon-centred free radicals. Reaction of the antimalarial and anti-schistosomal drug artemether (**11b**), an artemisinin derivative, (Fig. 3) and catalytic amount of ferrous ion in the presence of excess cysteine gave two adducts of cysteine and previously postulated carbon-centred free radicals that were trapped with 2-methyl-2-nitrosopropane (MNP) and provided the very first direct evidence for the involvement of radicals in the *in vitro* cleavage of artemisinin-type compounds [49]. This piece of further evidence for the presence of carbon-centered radicals, especially the secondary carbon-centered free radical

detected for the first time by the isolation of its coupling adduct, is helpful to understand the mechanism of action of artemether and other qinghaosu derivatives against parasites [50].

Two important pathogens of developing countries, *Mycobacterium leprae*, the etiologic agent of leprosy, and *Leishmania donovani*, the protozoal parasite that causes kalaazar, persist in the human host primarily in mononuclear phagocytes. The mechanisms by which they survive in these otherwise highly cytotoxic cells are presently unknown. Since the best understood cytotoxic mechanism of these cells is the oxygen-dependent system that provides lethal oxidants including the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical ($OH\cdot$), and singlet oxygen (1O_2), Chan *et al.* [51] sought specific microbial products of these organisms that might enable them to elude oxidative cytotoxic mechanisms. Phenolic glycolipid I of *M. leprae* and lipophosphoglycan of *L. donovani* are unique cell-wall-associated glycolipids produced in large amounts by the organisms. In this study, phenolic glycolipid I derivatives and lipophosphoglycan were examined for their ability to scavenge potentially cytotoxic oxygen metabolites *in vitro*. ESR and spin-trapping indicated that phenolic glycolipid I derivatives and lipophosphoglycan are highly effective in scavenging hydroxyl radicals and superoxide anions. The results suggested that complex glycolipids and carbohydrates of intracellular pathogens that can scavenge oxygen radicals may contribute to their pathogenicity and virulence [51].

The cytotoxins produced by phagocytic cells lacking peroxidases such as macrophages remain elusive. To elucidate macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*, Linares *et al.* compared the lesion tissue responses of resistant (C57Bl/6) and susceptible (BALB/c) mice to *Leishmania amazonensis* infection. This comparison demonstrated that parasite control relied on lesion macrophage activation with inducible nitric oxide synthase expression (iNOS), nitric oxide synthesis, and extensive nitration of parasites inside macrophage phagolysosomes at an early infection stage. Nitration and iNOS expression were monitored by confocal microscopy; nitric oxide synthesis was monitored by ESR. The main macrophage nitrating agent was shown to be peroxynitrite-derived because parasite nitration occurred in the virtual absence of polymorphonuclear cells (monitored as peroxidase activity) and was accompanied by protein hydroxylation (monitored as 3-hydroxytyrosine levels). *In vitro* studies confirmed that peroxynitrite is cytotoxic to parasites whereas nitric oxide is cytostatic. The results indicated that peroxynitrite is likely to be produced close to the parasites and most of it reacts with carbon dioxide to produce carbonate radical anion and nitrogen dioxide whose concerted action leads to parasite nitration. In parallel, some peroxynitrite decomposition to the hydroxyl radical should occur due to the detection of hydroxylated proteins in the healing tissues. Consequently, peroxynitrite and derived radicals are likely to be important macrophage-derived cytotoxins [52].

While some groups studying parasitic diseases focus their work on free radical generation as the mechanisms of action, some have concentrated on the synthesis of new pharmaceutical agents by the coordination of antiprotozoal organic drugs [53]. Others have tested antitumor metal-

containing complexes such as cisplatin against kinetoplastid parasites [54]. These studies showed that the tested compounds display biological activity against protozoa, results that, along with the fact that many antiprotozoal drugs bind to DNA leads to expect that in general every DNA interacting compound could be active against parasites and that one of the mechanisms possible is through free radical generation [55].

Similar is the case of paramagnetic complexes [Cu(dppz)(NO₃)]NO₃ (15), [Cu(dppz)₂(NO₃)]NO₃ (16), [Cu(dpq)(NO₃)]NO₃ (17), and [Cu(dpq)₂(NO₃)]NO₃ (18) (dppz: dipyrro[3,2-a:2',3'-c]phenazine; dpq: dipyrro[3,2-a:2',3'-h]quinoxaline) whose molecular structure was characterized by ESR, among other spectroscopies [56]. DNA interaction studies showed that intercalation is an important way of interacting with DNA for these complexes. The biological activity of these copper complexes was evaluated on *Leishmania braziliensis* promastigotes, and the results showed leishmanicidal activity. Preliminary ultrastructural studies with the most active complex (16) at 1 h revealed parasite swelling and binucleated cells. This finding suggests that the leishmanicidal activity of the copper complexes could be associated with their interaction with the parasitic DNA, results in agreement with the ESR results indicating that the spectra for complexes (15) and (17) showed a high symmetry in the plane of the copper, which is indicative of a high electron density in the copper plane. These results lead to propose a square planar structure for those complexes. The spectrum of complex (16) showed an asymmetry in the plane of the copper and the hyperfine splitting resolution is almost totally lost. The spectrum of compound (18) showed a slight distortion of the planar symmetry, with loss of resolution in the lines corresponding to the hyperfine splitting.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by FONDECYT 1030949, 7040037 grant, CONICYT AT-4040020 grant, U. de Chile DID graduate grant PG-65, and CEPEDQ.

REFERENCES

- [1] a-Schofeld, C. *J. Br. Med. Bull.* 1985, 41, 187.
- [2] Weil, J. A.; Bolton, J. R.; Wertz, J. E. *Electron Paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications.* John Wiley & Sons, Inc. 1994.
- [3] Rowlands, C. C and Murphy D. M. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, Magnetic resonance, Chemical Applications of EPR.* Elsevier Ltd. 2004, pp. 190-198
- [4] Rosen G.; Britigan B.; Halpern H. and Pou S. *Free Radicals, Biology and Detection by Spin Trapping,* Oxford University Press, 1999.
- [5] Lagercrantz, C. *J. Phys. Chem.* 1971, 75, 3466.
- [6] Perkins, M. *J. Adv. Phys. Org. Chem.* 1980, 17, 1.
- [7] Janzen EG, Haire DL. In: *Tanner DD, ed. Advances in Free Radical Chemistry.* Greenwich, CT: JAI Press, 1990, pp. 253-295.
- [8] Gilbert, B. C.; Davies, M. J.; Murphy, D. M. *Recent developments in EPR spin trapping. eds. Electron Spin Resonance.* Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002, Vol. 18 pp. 47-73.
- [9] Davies, M. J.; Timmins, G. S.; Clark, R. J. H.; Hester, R. E., *EPR spectroscopy of biologically relevant free radicals in cellular, ex vivo, and in vivo systems.* Biomedical applications of Spectroscopy, New York/London: Wiley; 1996, pp. 217-266.
- [10] Buettner, G. R. *Free Radic. Biol. Med.* 1987, 3, 259.
- [11] Roberto Docampo. *Chem. Biol. Interactions* 1990, 73, 1.
- [12] Cerecetto, H., Mester, B., Onetto, S., Seoane, G., González, M. and Zinola, Z. *Il Farmaco.* 1992, 47, 1207.
- [13] Cerecetto, H.; Di Maio, R.; Ibaruri, G.; Seoane, G.; Denicola, A.; Peluffo, G.; Quijano, C. and Paulino, M. *Il Farmaco.* 1998, 53, 89.
- [14] Di Maio, R.; Cerecetto, H.; Seoane, G.; Ochoa, C.; Arn, V.J.; Pérez, E.; Gómez, A.; Muelas, S. and Martínez, A.R. *Arzneimittel-Forsch. Drug. Res.* 1999, 49, 759.
- [15] Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Risso, M.; Sagrera, G.; Seoane, G.; Denicola, A.; Peluffo, G.; Quijano, C.; Basombry, M.A.; Stoppani, A.O.M.; Paulino, M. and Olea-Azar, C. *Eur. J. Med. Chem.* 2000, 35, 343.
- [16] Docampo R., and Moreno S.N. *J. Rev. Infect. Dis.* 1984, 6, 223.
- [17] Hazra B., Sur P., Banerjee A, and Roy D.K. *Planta Med.* 1984, 51, 295.
- [18] Estani, S.S.; Segura, E.L. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1999, 94, Suppl. I, 363.
- [19] Díaz, E. G.; Montalto de Mecca, M. and Castro, J. A. *J. Appl. Toxicol.* 2004, 24, 189.
- [20] Olea-Azar C, Atria A, Di Maio R., Seoane G. and Cerecetto H. *Spectroscopy Letters* 1998, 31, 849.
- [21] Olea-Azar C., Atria A., Mendizabal F., Di Maio R., Seoane G. and Cerecetto H. *Spectroscopy Letters* 1998, 31, 99.
- [22] Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Mendizabal, F.; Morello, A.; Maya, J.; Moncada, C.; Cabrera, E.; Di Maio, R.; González, M. and Cerecetto H. *Free Radical Research* 2003, 37, 993.
- [23] Tshako, M.; Alves, M.; Colli, W.; Brener, Z. and Augusto, O. *Biochem. Pharm.* 1989, 38, 4491.
- [24] Viode C, Bettache N, Cenas N, Krauth-Siegel RL, Chauviere G, Bakalara N, Perie J. *Biochem. Pharmacol.* 1999, 57, 549.
- [25] Aguirre, G., Boiani, L., Cerecetto, H., Fernandez, M.; Gonzalez, M.; Denicola, A.; Otero, L.; Gambino, D.; Rigol, C.; Olea-Azar, C. and Faundez, M. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2004, 12, 4885.
- [26] Cahill, A.; Whit, I. N. *Biochem. Soc. Trans.* 1991, 19, 1275.
- [27] Brown J.M. *Selective Activation of Drugs by Redox Processes,* Plenum Press, Fermo, Italy, 2000, pp. 137-148.
- [28] Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Risso, M.; Saenz, P.; Seoane, G.; Denicola, A.; Peluffo, G.; Quijano, C.; Olea-Azar, C. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 1941.
- [29] Olea-Azar, C.; Rigol, C.; Mendizabal, F.; Briones, R.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Risso, M. *Spectrochimica Acta Part A* 2003, 59, 69.
- [30] Iheanacho, E.N.; Sarel, S.; Samuni, A.; Avramovici-Grisaru, S.; Spira, D.T. *Free Radic Res Commun.* 1991, 15, 1.
- [31] Cohen, G. and Hochstein, P. *Biochemistry* 1964, 3, 895.
- [32] J. L. Holtzman. *Life Sci.* 1981, 30, 1.
- [33] Ohara, A.; Schreiber, J. and Mason, R. P. *Biochem. Pharmacol.* 1988, 37, 2791.
- [34] Vasquez-Vivar, J. and Ohara, A. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47, 309-316.
- [35] Becker, K.; Tilley, L.; Vennerstrom, J.; Roberts, D.; Rogerson, S. and Ginsburg. *International Journal for Parasitology* 2004, 34, 163.
- [36] Deslauriers, R.; Butler, K.; Smith, I.C. *Biochim. Biophys. Acta.* 1987, 931, 267.
- [37] Driscoll, J. S.; Hazard, G. F.; Wood, H. B. and Goldin, A. *Cancer Chemoth. Rep. (Part 2)* 1974, 4, 1.
- [38] Lind, C.; Hochstein, P. and Ernster, L. *Arch Biochem Biophys.* 1982, 216, 178.
- [39] Thor, H., Smith, M. T., Hartzell, P., Bellomo, G., Jewell, S. A., and Orrenius, S. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 12419.
- [40] Thor, H.; Smith, M. T.; Hartzell, P. and Orrenius, S. *Cytochrome P-450, Biochemistry, Biophysics, and Environmental Implications.* Elsevier Biomedical Press, New York. 1982, pp. 729-732.
- [41] Van de Straat, R.; de Vries, J. and Vermeulen, N. P. E. *Biochemical Pharmacology* 1987, 36, 613.
- [42] Takahashi, N.; Schreiber, J.; Fischer, V. and Mason, R. P. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1987, 252, 41.
- [43] Wefers, H. and Sies, H. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1983, 224, 568.
- [44] Gant, T. W.; D'Arcy Doherty, M.; Odowole, D.; Sales, K. D. and Cohen, G. M. *FEBS Lett.* 1986, 201, 296-300.
- [45] Antimalarials, C.C.R.G.o.Q.a.I.D.a., *J. Tradit. Chin. Med.* 1972, 2, 38.
- [46] Brossi, A.; Venugopalan, B.; Dominguez Gerpe L.; Yeh, H.J.; Flippen-Anderson, J.L.; Buchs, P.; Luo, X.D.; Milhous, W.; Peters, W.J.; *Med. Chem.* 1988, 31, 64550.

- [47] Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford. 1999.
- [48] Meshnick, S. R. *International Journal for Parasitology* 2002, 32, 1655.
- [49] Wen-Min Wu, Yikang Wu, Yu-Lin Wu, Zhu-Jun Yao, Cheng-Ming Zhou, Ying Li and Feang Shan *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 3316.
- [50] Wen-Min, W.; Yan-Li, C.; Zhai, Z.; Shu-Hua, X. and Yu-Lin, W., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003, 13, 1645.
- [51] Chan, J.; Fujiwara, T.; Brennan, P.; McNeil, M.; Turco, S.; Sibille, J.; Snapper, M.; Aisen, P.; and Bloom, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 2453.
- [52] Linares, E.; Giorgio, S.; Mortara, R.A.; Santos, C.X.; Yamada, A.T.; Augusto, O. *Free Radic Biol. Med.* 2001, 30, 1234.
- [53] Navarro, M.; Lehmann, T.; Cisneros-Fajardo, E. J.; Fuentes, A.; Sánchez-Delgado, R. A.; Silva, P.; Urbina, J. A. *Polyhedron* 2000, 19, 2319.
- [54] Farrel, N. P. *Biochemical Pharmacology* 1984, 33, 961.
- [55] Hugo Cerecetto, Mercedes González, Mariela Risso, Patricio Saenz, Claudio Olea-Azar, Ana M. Bruna, Amaia Azqueta, Adela López de Ceráin and Antonio Monge. *Archiv der Pharmazie* 2004, 337, 271.
- [56] Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E.J.; Sierralta, A.; Fernandez-Mestre, M.; Silva, P.; Arrieche, D.; Marchan, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2003, 8, 401.





Electrochemical and ESR study of 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazones antiprotozoal drugs

Carolina Rigol^a, C. Olea-Azar^{a,*}, Fernando Mendizábal^b,
Lucía Otero^c, Dimorah Gambino^c, Mercedes González^d,
Hugo Cerecetto^d

^a Departamento de Química Inorgánica y Analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Olivos 1007 Independencia, Santiago, Chile

^b Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Chile

^c Cátedra de Química Inorgánica, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay

^d Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química/Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

Received 6 September 2004; received in revised form 2 November 2004; accepted 2 November 2004

Abstract

Cyclic voltammetry and electron spin resonance (ESR) techniques were used in the investigation of several potential antiprotozoal thiosemicarbazones nitrofurane derivatives.

A self-protonation process involving the protonation of the nitro group due to the presence of an acidic proton in the thiosemicarbazone moiety was observed in the first step of a CEE_{rev} reduction mechanism of these derivatives.

ESR spectra of the free radicals obtained by electrolytic reduction were characterized and analyzed. AMI methodology was used to obtain the optimized geometries and UB3LYP calculations were performed to obtain the theoretical hyperfine coupling constants. The theoretical study exhibited an unusual assignment of the spin densities showing a free radical centered in the thiosemicarbazone moiety rather than the nitro which are in agreement with the experimental hyperfine pattern.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cyclic voltammetry; ESR; 5-Nitrofurane derivatives; Anion free radical; *T. cruzi*

1. Introduction

5-Nitrofuranes have found popular use in the treatment of parasitic infections because of their antiprotozoal-antibacterial activity [1]. In Latin America, parasitic diseases represent a major health problem. In particular, Chagas' disease (American Trypanosomiasis), caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, affects approximately 20 million people from Southern California to Argentina and Chile [2,3].

The current chemotherapy against this parasite is still inadequate due to the undesired side effects caused by the drugs in use [4].

Experiments carried out on the main drugs used in Chagas treatment suggest that intracellular reduction followed by redox cycling yielding reactive oxygen species (ROS) may be their major mode of action against *T. cruzi*. These can cause cellular damage directly by reacting with various biological macromolecules, or indirectly by generation of the highly reactive hydroxyl radical via iron-mediated Haber-Weiss and Fenton reactions [5,6,8].

The redox metabolism in trypanosomatids is unique in being based on the bis-glutathionylspermidine conjugate, trypanothione, and the flavoenzyme trypanothione

* Corresponding author. Tel.: +56 2 6782834; fax: +56 2 7370567.

E-mail address: colea@uchile.cl (C. Olea-Azar).

reductase (TR). The trypanothione system, which replaces the glutathione/glutathione reductase (GR) system, quite omnipresent in mammals, protects the parasites from oxidant damage, among other phenomena. The known sensitivity of trypanosomatids towards ROS renders the enzymes of the trypanothione metabolism promising targets for the development of parasite-specific drugs [7].

We have previously reported studies on antiprotozoal 5-nitrofurfural and 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde derivatives. These compounds showed to generate nitro anion radicals, which were characterized using ESR spectroscopy [8–10].

The study of several drugs designed in order to imitate the trypanothione spermidine group reported the generation of nitro anion and hydroxyl radicals by microsomal reduction in presence of *T. cruzi* epimastigotes [10].

Electron spin resonance (ESR) and electrochemical methods, such as cyclic voltammetry, are now widely accepted and well developed as powerful tools in the identification of paramagnetic intermediates and other reaction products [8,11,12]. On the other hand, density functional methods are capable of providing reasonable predictions for ESR properties, the best results being obtained with the hybrid schemes such as the standard B3LYP [13].

In the present work, a family of eight 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazone derivatives were studied [14]. These compounds were developed as hybrid compounds that could act against *T. cruzi* by a dual mechanism of action, oxidative stress and inhibition of cruzain throughout their nitro and thiosemicarbazone moieties, respectively. Cruzain is the major cysteine protease of *T. cruzi*; cruzain inhibition is currently one of the most advanced and widely studied strategies in the design of new drugs for the treatment of American trypanosomiasis [15]. Recently, it has been described that some thiosemicarbazone derivatives exhibit potent activity against cruzain as well as trypanocidal activity against parasites in cell culture [16]. The reduction pathway of this family of compounds was studied using cyclic voltammetry and the radical species were characterized using ESR. In order to estimate the theoretical hyperfine splitting constants, an open shell B3LYP methodology was carried out.

2. Experimental section and theoretical methods

2.1. Samples

The 5-nitrofuryl-containing thiosemicarbazone derivatives (Fig. 1) were synthesized according to methods described earlier [14].

2.2. Cyclic voltammetry

DMSO (spectroscopy grade) was obtained from Aldrich. Tetrabutylammonium perchlorate (TBAP), used as supporting electrolyte, was obtained from Fluka. Cyclic voltammetry was carried out using a Metrohm 693 VA instrument with a 694 VA Stand convertor and a 693 VA Processor, in DMSO (ca. $1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), under a nitrogen atmosphere at room temperature, with TBAP (ca. 0.1 mol L^{-1}), using a three-electrode cell. A mercury-dropping electrode was used as the working electrode, a platinum wire as the auxiliary electrode, and saturated calomel as the reference electrode.

2.3. ESR spectroscopy

ESR spectra were recorded in the X band (9.7 GHz) using a Bruker ECS 106 spectrometer with a rectangular cavity and 50 kHz field modulation. The nitro radicals were generated by electrolytic reduction in situ under the same conditions of temperature, atmosphere and concentrations stated at the voltammetric experiment. Simulations of the spectra were made using the Simfonia Version 1.25 software. The hyperfine splitting constants were estimated to be accurate within 0.05 G.

2.4. Theoretical calculations

Full geometry optimizations, in vacuo, of the nitrofurans in spin-paired forms were carried out using AM1 semi empirical methodology. The theoretical hyperfine constants were calculated using the open shell UB3LYP methodology with the 6-31G* basis set.

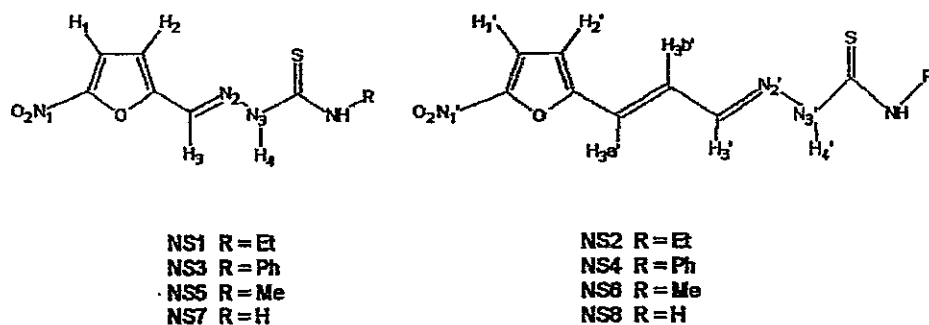


Fig. 1. Chemical structure of the nitrofuran of thiosemicarbazone derivatives.

3. Results and discussion

3.1. Cyclic voltammetry

Fig. 2 shows the voltammogram displayed by the nitrofurane family when a DMSO solution of 1 mM of nitrofurane NS3 derivative and 100 mM of TBAP is swept from 0 to -2.6 V. We notice clearly a one-electron reversible transfer (peak IIIc/IIIa Fig. 2) corresponding to the generation of the radical anion $\text{RNO}_2^{\bullet-}$ around -0.80 V. We studied the stability of the radical intermediates by changing the electrochemical conditions i.e. the scan rate, while keeping the chemical conditions of the solution unaltered. We observe that the $i_p/a/i_p/c$ ratio calculated with the Nicholson and Shain equation [17] increases slightly as the scan rate increases (from 100 to 2000 mV/s), as is typical for a reversible charge transfer (results not shown) [18]. All of the nitrofuranes exhibited lower $E_{1/2}$ ($E_{1/2} = (E_a + E_c)/2$) values than Nifurtimox (-0.88 V [8]) showing a higher capacity to be reduced, hence, a better ability to generate the radical species.

Table 1 lists the values of voltammetric peaks and the anodic and cathodic currents for all compounds plus nifurtimox taken from reference [8]. All compounds display comparable voltammetric behaviour, in DMSO.

The subsequent more negative three-electron irreversible cathodic peak (IVc, Fig. 2) belonging to the production of the hydroxylamine derivative [10] is irreversible in the whole range of sweep rates used (100–2000 mV/s) for all eight compounds. Sharp peaks can be noticed in some voltammograms at low sweep rates as a result of an adsorption phenomenon in the electrode surface due to the presence in the molecules of the thiocarbonyl group (results not shown).

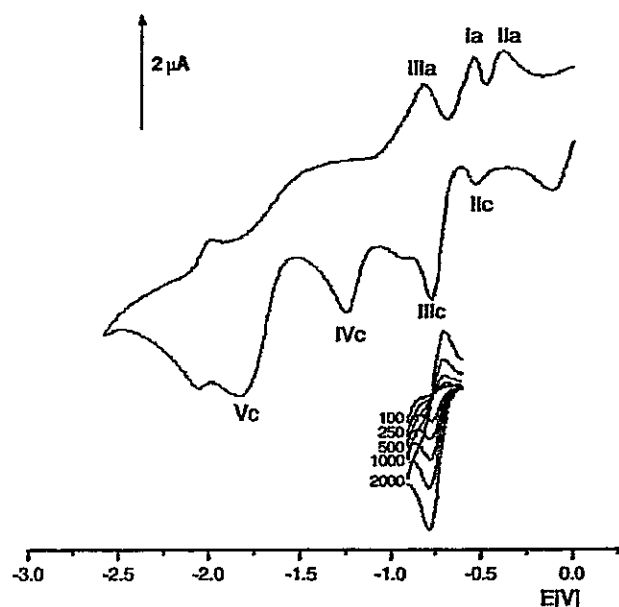


Fig. 2. Cyclic voltammograms of 1 mM NS3 sweep rates of wave III from 100 to 2000 in 100% DMSO with 0.1 M TBAP.

Table 1

Cyclic voltammetric parameters corresponding to the nitro moiety reduction of couple III and IV vs. saturated calomel electrode in DMSO

| Nitrofurans | E_{pIIIc} (V) | E_{pIIIa} (V) | ΔE (V) | $E_{1/2}$ (V) ^a | $i_p/a/i_p/c$ | E_{pIVc} (V) |
|-------------|--------------------|-----------------|----------------|----------------------------|---------------|----------------|
| NS1 | -0.79 | -0.71 | 0.08 | -0.75 | 1.03 | -1.42 |
| NS2 | -0.79 | -0.71 | 0.08 | -0.75 | 1.07 | -1.28 |
| NS3 | -0.78 | -0.70 | 0.08 | -0.74 | 0.88 | -1.26 |
| NS4 | -0.77 | -0.70 | 0.07 | -0.74 | 0.94 | -1.12 |
| NS5 | -0.79 | -0.71 | 0.08 | -0.75 | 1.04 | -1.40 |
| NS6 | -0.79 | -0.70 | 0.09 | -0.75 | 1.08 | -1.26 |
| NS7 | -0.84 | -0.75 | 0.09 | -0.80 | 0.95 | -1.42 |
| NS8 | -0.84 | -0.72 | 0.12 | -0.78 | 1.03 | -1.31 |
| Nifurtimox | -0.91 ^b | -0.85 | 0.06 | -0.88 | 1.01 | - ^c |

^a $E_{1/2} = (E_{pIIIc} + E_{pIIIa})/2$.

^b Data from reference [8].

^c Data not shown in reference [8].

The voltammogram of all nitrofuranes show one anodic peak around -0.6 V (Ia), that could be attributed to the reoxidation process of the hydroxylamine RNHOH generated in IVc into RNO. A successive second sweep exhibits a shoulder peak near IIc which could be attributed to the cathodic counterpart from the reversible reaction $\text{RNHOH} \rightleftharpoons \text{RNO} + 2e^- + 2\text{H}^+$ (figure not shown). In addition, a prepeak (IIc) appears even before the reduction of the nitro group, meaning that the nitro group follows another reaction path beside the known electron-transfer mechanism of nitroaromatic compounds in aprotic media. This prepeak corresponds to the four-electron reduction of a small portion of the molecules reaching the electrode surface, while the remaining portion supplies the protons required for this reduction. The presence of the nitro group increases the acidity of the N–H moiety from the thiosemicarbazone group (N_3H_4 , Fig. 1) which becomes capable of protonating the nitro group of a minor part of molecules in the solution, resulting into a lower intensity of these signals. This is a typical behavior of a self-protonation phenomenon displayed by nitrocompounds with acidic moieties in their structure [19–22]. Peak IIa as the counterpart of IIc belongs actually to the two-electron oxidation of the hydroxylamine into the nitroso compound as happens in Ia. In summary, we observe, thus in waves III and IV, the reduction of the anionic molecules that supplied the protons for reaction Ic to take place.

Peak V observed in the voltammograms is presumed to belong to the reduction of the imine moiety ($\text{CH}=\text{N}$) of the thiosemicarbazone group [23]. Peaks not labeled in Fig. 2 correspond to the reduction of the support electrolyte (TBAP).

Finally, the reduction mechanism for these nitrofurane derivatives comprising waves III–V, and prepeaks I and II observed in the cyclic voltammograms (Fig. 2), is proposed in Fig. 3.

3.2. Electron spin resonance and theoretical calculations

The nitrofurane free radicals characterized by ESR were prepared in situ by electrochemical reductions in DMSO,

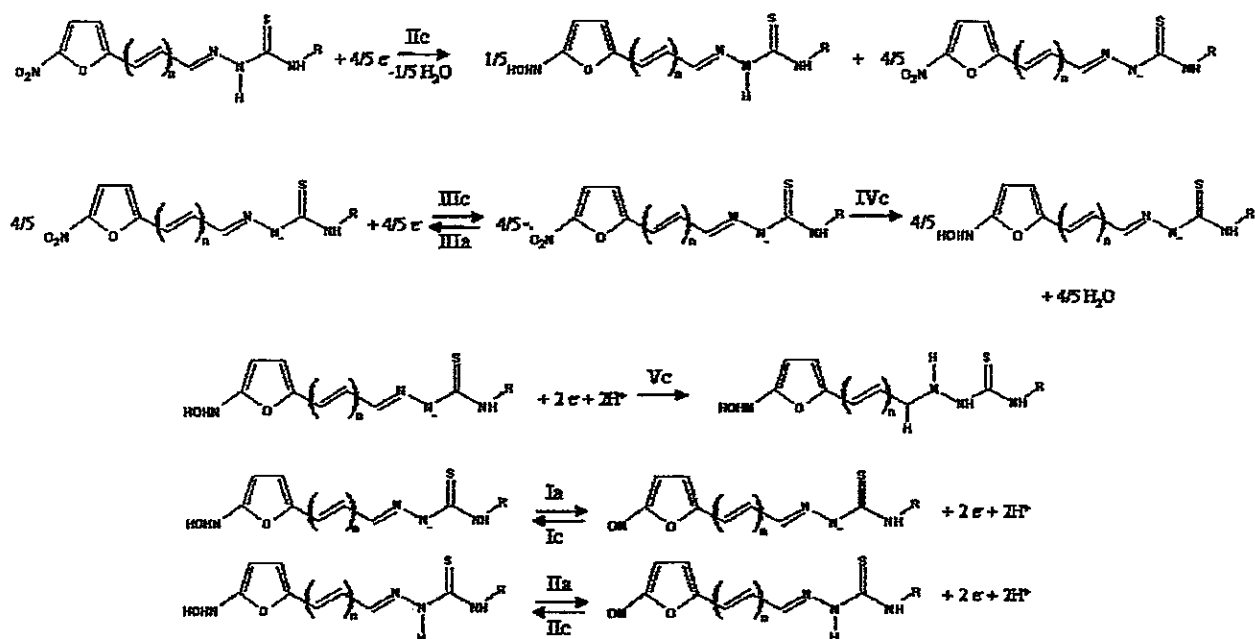


Fig. 3. Reduction mechanism suggested for the nitrofurane derivatives.

applying a potential corresponding to peak IIIc obtained from the voltammetric experiments. All the investigated structures formed stable paramagnetic intermediates at that first reduction step.

The interpretation of the ESR by means of a simulation process confirmed the stabilities of these radical species due to the delocalization of the unpaired electron. The simulation of the spectra was made using hyperfine coupling constants (hfccs) obtained from the DFT calculations, modifying the linewidth, modulation amplitude and Lorentzian/Gaussian component until the obtained spectra reached the greatest similarity with the experimental ones. Table 2 reports the hfccs obtained from the DFT calculations.

NS1 free radical (Fig. 1) displays a simulated spectrum of two triplets assigned to the nitro group (N_1 , Fig. 1) and the imine (N_2) nitrogen atoms and four doublets assigned to nuclei H_1 from the furan ring, H_3 belonging to the imine group, and two of the hydrogen atoms of the CH_2 moi-

ety of the ethyl group which are assigned by theoretical calculation.

The simulated spectrum of NS3 radical results from a pattern of three triplets from nitrogens N_1 , N_2 and N_3 directly bound to N_2 , and two doublets from H_1 and H_3 .

NS5 free radical spectrum was simulated in terms of two triplets assigned to nuclei N_1 and N_2 and three doublets assigned, one to nuclei H_1 , and the others to two of the hydrogen atoms of the methyl group.

NS7 free radical spectrum was simulated in terms of three triplets from nitrogens N_1 , N_2 and N_3 and four doublets belonging to hydrogens H_1 , H_3 and both hydrogens of the amine moiety.

In the analysis of NS2 free radical spectrum, we observe a signal pattern of three triplets assigned to the nitrogen of the nitro group (N'_1), the imine (N'_2) and the thiosemicarbazone (N'_3), and four doublets assigned to nuclei H'_1 and H'_2 from the furan ring and $H_{3a'}$ and $H_{3b'}$ belonging to the $CH=CH$ group.

Table 2
Hyperfine splittings (Gauss) assigned by UB3LYP/6-31G* methodology and experimental *g* values nitro anion radicals

| Nitrofurane | aN_1 | aN_2 | aN_3 | aH_1 | aH_3 | aR | <i>g</i> values |
|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------|-----------------|
| NS1 | 2.49 | 8.76 | – | 3.43 | 1.33 | $2 \times 0.36 (CH_2)$ | 2.0170 |
| NS3 | 2.07 | 5.47 | 1.09 | 2.66 | 1.50 | – | 2.0164 |
| NS5 | 2.16 | 7.43 | – | 3.02 | – | $2 \times 2.18 (CH_3)$ | 2.0162 |
| NS7 | 1.19 | 6.98 | 1.57 | 1.17 | 2.59 | $2 \times 1.06 (NH_2)$ | 2.0158 |

| Nitrofurane | aN'_1 | aN'_2 | aN'_3 | aH'_1 | aH'_2 | $aH_{3a'}$ | $aH_{3b'}$ | aH'_3 | aR' | <i>g</i> values |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|------------|------------|---------|-----------------|-----------------|
| NS2 | 0.99 | 6.54 | 1.20 | 0.68 | 1.32 | 3.08 | 6.52 | – | – | 2.0167 |
| NS4 | 0.78 | 4.42 | 1.20 | – | 1.25 | 2.71 | 3.94 | 0.73 | – | 2.0177 |
| NS6 | 1.54 | 6.24 | 1.57 | 1.08 | 1.08 | 4.82 | 4.84 | 0.94 | 1.28 (CH_3) | 2.0156 |
| NS8 | 0.99 | 6.49 | 1.14 | 0.68 | 1.30 | 3.04 | 6.55 | – | – | 2.0158 |

The magnetic nuclei are named according to Fig. 1.

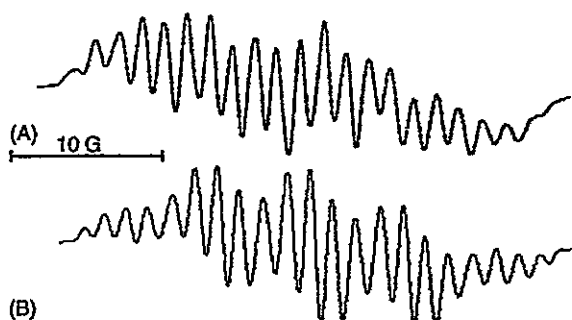


Fig. 4. (A) ESR experimental spectrum of NS6 nitro radical produced by an electrochemical generation in DMSO with 1 mM of nitrofurane and 100 mM TBAP. *Spectrometer conditions:* microwave frequency, 9.71 GHz; microwave power, 20 mW; modulation amplitude, 0.2 G; scan rate, 1.25 G/s; time constant, 0.5 s; number of scans 15. (B) Computer simulation of the same spectrum using DFT-calculated hfccs. Spectrum was simulated using the following parameters: line width, 0.9 G; ratio Lorentzian/Gaussian, 1.0; hyperfine constants included in Table 2. G, Gauss.

NS4 free radical spectrum was simulated in terms three triplets from nitrogens N'_1 , N'_2 and N'_3 and four doublets from H'_2 , H'_3a' , H'_3b' and H'_3 .

The simulated spectrum of NS6 radical form (Fig. 4) resulted from a signal pattern of three triplets assigned to nuclei N'_1 , N'_2 and N'_3 , and six doublets assigned to nuclei H'_1 , H'_2 , H'_3a' , H'_3b' , H'_3 , and one hydrogen atom of the methyl group.

Finally, NS8 free radical spectrum was simulated in terms of three triplets from nitrogens N'_1 , N'_2 and N'_3 and four doublets belonging to hydrogens H'_1 , H'_2 , H'_3a' , and H'_3b' .

Concerning the analysis of the data obtained from the theoretical calculations and its use in the simulation of the ESR spectra, we found that the optimization of the geometries showed a direct dependence of the structure's conformation on the hfccs. Nitrocompounds typically localize their unpaired electron in the nitro group [6], however, this family of nitrofuranes showed a different behavior centering the spin electron density around nuclei N_2 , N'_2 and H_3 , H_3a' , H_3b' (Fig. 1). The radical species of NS1, NS3, NS5, NS7 (Fig. 1) display delocalized spin densities between nuclei N_1 (nitro group), H_1 , N_2 and H_3 (Table 2). On the other hand, radicals of NS2, NS4, NS6, NS8 delocalize the unpaired electron through the conjugate planar system providing nuclei N'_2 , H_3a' and H_3b' with high spin densities.

4. Concluding remarks

All nitrofuranes studied showed lower $E_{1/2}$ potentials than Chagas' treatment drug Nifurtimox which provides them of promissory antitrypanosomal activity. The reduction of the nitro group of the thiosemicarbazone nitrofuranes exhibits a self-protonation reaction between the acidic proton of the thiosemicarbazone group (H_4 , H'_4 , Fig. 1) and the nitro moiety revealing a CEE_{rev} reduction mechanism. This kind of self-protonating reactions destabilizes the nitro radical anion-giving place to a multi-electron reduction of the nitro moiety

to produce the corresponding anion hydroxylamine intermediate [19].

The donor/acceptor capacity of the substituents does not seem to affect significantly the reduction potentials of the derivatives; only the non-substituted derivatives display differences in their potentials. However, the conformations adopted by the radical species, influenced by their interaction with the solvent, affects in the delocalization of the unpaired electron.

The theoretical calculations showed that the spin density is in general higher in the thiosemicarbazone nitrogen, opposing to the results of other nitro radical species [7], which means that the unpaired electron accepted by the nitro moiety, as stated by the voltammetric study, rapidly delocalizes to the other nuclei of the molecule.

UB3LYP/6-31G* proved to be a good methodology in the calculation of ESR hyperfine coupling constants for this kind of molecules, making the simulation process much simpler.

Acknowledgments

This research was supported by FONDECYT 1030949 grant, CONICYT AT-4040020 grant, U. de Chile DID graduate grant PG-65, CEPEDEQ, RELAQ, and TWAS. L.O. thanks to UDELAR and RTPD for training fellowships.

References

- [1] W.Z. Raether, H. Hanel, *Parasitol. Res.* 1 (2003) 19.
- [2] J.A. Urbina, R. Docampo, *Trends Parasitol.* 19 (2003) 495.
- [3] World Health Organization, <http://www.who.int/ctd/chagas/burdens.htm>.
- [4] H. Cerecetto, M. Gonzalez, *Curr. Top. Med. Chem.* 2 (2002) 1187.
- [5] R. Docampo, S.N.J. Moreno, *Rev. Infect. Dis.* 6 (1984) 223.
- [6] S.N. Moreno, R.P. Mason, R. Docampo, *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 6298.
- [7] L. Thomson, A. Denicola, R. Radi, *Arch. Biochem. Biophys.* 412 (2003) 55.
- [8] C. Olea-Azar, A.M. Atria, F. Mendizabal, R. Di Maio, G. Seoane, H. Cerecetto, *Spectrosc. Lett.* 31 (1998) 99.
- [9] C. Olea-Azar, A. Atria, R. Di Maio, G. Seoane, H. Cerecetto, *Spectrosc. Lett.* 31 (1998) 849.
- [10] C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizabal, A. Morello, J.D. Maya, C. Moncada, E. Cabrera, R. Di Maio, M. Gonzalez, H. Cerecetto, *Free Radic. Res.* 37 (2003) 993.
- [11] C. Olea-Azar, C. Rigol, F. Mendizabal, H. Cerecetto, R. Di Maio, M. González, W. Porcal, C. Moncada, A. Morello, Y. Repetto, J.D. Maya, *Spectrochim. Acta A* 59 (2003) 69.
- [12] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, second ed., Wiley-VCH, 2000, p. 28.
- [13] W. Koch, M.C. Holthausen, *A Chemist's Guide to Density Functional Theory*, second ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001 (Chapter 11).
- [14] G. Aguirre, L. Boiani, H. Cerecetto, M. Fernández, M. González, A. Denicola, L. Otero, D. Gambino, C. Rigol, C. Olea-Azar, M. Faúndez, *Med. Chem.* 12 (2004) 4885.
- [15] (a) J.J. Cazzulo, *Curr. Top. Med. Chem.* 2 (2002) 1261; (b) L. Huang, A. Lee, J.A. Ellman, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 676.

- [16] (a) X. Du, E. Hansell, J.C. Engel, C.R. Carey, F.E. Cohen, J.H. McKerrow, *Chem. Biol.* 7 (2000) 733;
(b) X. Du, C. Guo, E. Hansell, P.S. Doyle, C.R. Carey, T.P. Holler, J.H. McKerrow, F.E. Cohen, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2695.
- [17] R.S. Nicholson, *Anal. Chem.* 38 (1966) 1406.
- [18] R. Nicholson, I. Shain, *Anal. Chem.* 36 (1964) 706.
- [19] J.A. Bautista-Martínez, I. González, M. Aguilar-Martínez, *Electrochim. Acta* 49 (2004) 3403.
- [20] J. Carbajo, S. Bollo, L.J. Núñez-Vergara, A. Campero, J.A. Squella, *J. Electroanal. Chem.* 531 (2002) 187.
- [21] G. Kokkinidis, A. Kelaidopoulou, *J. Electroanal. Chem.* 414 (1996) 197.
- [22] C. Amatore, G. Capobianco, G. Farnia, G. Sandonà, J.M. Savéant, M.G. Severin, E. Vianello, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 1815.
- [23] S. Bollo, E. Soto-Bustamante, L.J. Núñez-Vergara, J.A. Squella, *J. Electroanal. Chem.* 492 (2000) 54.